F1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 25

1982

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 25, nr. 1, p. 1—120, 1982, Bucureşti

SCBIAS 25 (1), 1982

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P. O. Box 136—137, telex 11226, 79517 - București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P. O. Box 2—2, 78200 - București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 25, nr. 1 1982

IANUARIE—IUNIE

SUMAR

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Acţiunea plumbului asupra unor dehidrogenaze renale 3

RODICA BÎRNESCU, S. VASU, Producerea lipazelor de către *Aspergillus niger* cultivat pe medii de cultură naturale (subproduse sau materiale refolosibile ale industriei alimentare) 7

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ, Degradarea β-glucozidazei de către catepsina B_1 14

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL, Obţinerea de energie din plante acvatice rezultate ca subprodus în epurarea apelor uzate 23

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL, Utilizarea plantelor acvatice ca sursă de energie 27

GAVRIL NEAMŢU, ALEXANDRU COCIU, Tratamentul rănilor la animale cu ulei extras din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* L.. 30

RADU OLINESCU, DESPINA TEODOSIU, Modificări ale lactatdehidrogenazei din ficat în urma iradierii cu radiaţii gamma *in vivo* 35

LIDIA POPA, HORST D. SCHELL, ELENA ENACHE, LUCIA LEPĂDAT, Studiul comparativ al proprietăţilor catalitice ale celulazelor, în stare liberă şi imobilizată, elaborate de *A spergillus terreus* 41

ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, S. S. VASU, Caracterizarea lactazei din *Aspergillus niger* 47

HORST D. SCHELL, LIDIA POPA, DONCA NICULESCU-MIZIL, MONIQUE ANDRIANTSIMIAVONA, Studiul proprietăţilor proteazelor neutre şi alcaline, în stare liberă şi imobilizată, elaborate de *Bacillus subtilis* 53

LOUIS KAMEL TADROS, DANIELA ANDREI, CECILIA MOTAŞ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a glicoproteinelor. XVII. Degradarea peroxidazei 59

M. TĂMAŞ, ELENA PROTOPOPESCU, Contribuţii la studiul fructozanilor din *Iris pseudacorus* L. 74

M. ZAMFIR, Influenţa unor cationi asupra determinării proteinelor prin metoda Lowry 78

M. ZAMFIR, S. S. VASU, Caracterizarea fizico-chimică şi biochimică a celulazelor din *Aspergillus niger* 90

REFERAT GENERAL

VICTORIA DOBRE, Lipozomii — preparare, proprietăţi, aplicaţii 96

RECENZII 108

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 25, N° 1 1982

JANUARY—JUNE

CONTENTS

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Lead action on some renal dehydrogenases 3

RODICA BÎRNESCU, S. VASU, Production of lipases by *Aspergillus niger* grown on natural culture media (by-products or wastes from food industry) 7

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ, β-glucosidase degradation by cathepsin B_1 . . 14

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL, Energy obtained from aquatic plants, a by-product in the purification of waste waters 23

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL, Aquatic plants as a source of energy 27

GAVRIL NEAMŢU, ALEXANDRU COCIU, Animal wound healing with oil extracted from ripe fruits of *Hyppophaë rhamnoides* L. 30

RADU OLINESCU, DESPINA TEODOSIU, Modifications of lactate dehydrogenase from the rat liver following the *in vivo* irradiation with gamma rays . . . 35

LIDIA POPA, HORST D. SCHELL, ELENA ENACHE, LUCIA LEPĂDAT, Vergleichende Undersuchung der katalytischen Eigenschaften der freien und trägerfixierten vom *Aspergillus terreus* gebildeten Cellulasen 41

ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, S. S. VASU, The characterization of lactase from *Aspergillus niger* 47

HORST D. SCHELL, LIDIA POPA, DONCA NICULESCU-MIZIL, MONIQUE ANDRIANTSIMIAVONA, Eigenschaften der freiten und trägergebundenen vom *Bacillus subtilis* gebildeten neutralen und basischen Proteasen 53

LOUIS KAMEL TADROS, DANIELA ANDREI, CECILIA MOTAŞ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of proteins.XVII. The degradation of peroxidase.. 59

M. TĂMAŞ, ELENA PROTOPOPESCU, Contributions to the study of fructosanes from *Iris pseudacorus L.* 74

M. ZAMFIR, The influence of metal ions on the protein determination by the Lowry procedure 78

M. ZAMFIR, S. S. VASU, The physico-chemical and biochemical characterization of cellulolytic enzymes from *Aspergillus niger* 90

GENERAL REVIEW

VICTORIA DOBRE, Liposomes — preparation, properties, applications 96

REVIEWS. 108

ACŢIUNEA PLUMBULUI ASUPRA UNOR DEHIDROGENAZE RENALE

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. S-a studiat acţiunea a două concentraţii de acetat de plumb (5 şi 10 mg) asupra activităţii piruvat- şi succinatdehidrogenazei, folosindu-se rinichiul izolat şi perfuzat de şobolan. Rezultatele obţinute au arătat o scădere semnificativă a activităţii piruvat-dehidrogenazei renale cînd rinichiul a fost perfuzat cu concentraţia de 10 mg acetat de plumb. Este posibil că acţiunea toxică a plumbului se datoreşte interacţiunii sale cu sistemul enzimatic NAD-dependent prin blocarea grupărilor funcţionale tiol ale acidului lipoic.

Asemănător toxicităţii altor metale grele (Cd, As, Hg etc.), plumbul manifestă o mare afinitate pentru grupările tiol active ale multor enzime şi proteine de structură (1), (2), (3).

Or, este bine cunoscut că în procesele metabolice oxidative participă din plin grupările sulfhidrilice, care au fost identificate în concentraţii relativ egale în toate zonele rinichiului, stimulînd activitatea multor enzime (dehidrogenaze, ATP-aze, hexokinaze etc.) (4).

Pornind de la aceste considerente şi avînd în vedere şi acţiunea toxică specifică a plumbului asupra rinichiului ca organ ţintă de acumulare şi eliminare, în lucrarea prezentă ne-am propus să studiem efectul administrării „in vitro" a diferitelor concentraţii de acetat de plumb pe rinichi izolat şi perfuzat de şobolan asupra activităţii unor dehidrogenaze renale.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele s-au efectuat pe un lot de 50 de şobolani albi, masculi, în greutate medie de 180—200 g.

S-a folosit rinichiul de şobolan, izolat şi perfuzat cu soluţie Ringer-Krebs, în care s-a adăugat acetat de plumb în concentraţii de 5 şi 10 mg%, după o tehnică utilizată de noi în alte lucrări precedente (5), (6), (7).

Principiul metodei aplicate constă în reducerea enzimatică a trifeniltetrazoliului în prezenţa diferitelor substrate şi în formarea de trifenilformazan, derivat de culoare roşie, solubil în solvenţi organici (8).

Substratele donatoare de hidrogen investigate au fost : piruvatul de sodiu (11,36 mM/l) şi succinatul de sodiu (8,47 mM/l), iar ca acceptor de hidrogen s-a folosit 2, 3, 5-trifeniltetrazoliul în concentraţie de 25 mg%. Durata perfuziei a fost de 30 min, temperatura 37°C, presiunea de 90 mmHg, ritmul perfuziei 1 ml/min.

Rinichiul şobolanilor martor a fost perfuzat în condiţii identice, cu excepţia faptului că în lichidul de perfuzie nu s-a adăugat acetatul de plumb.

După terminarea perfuziei, extractul acetonic de rinichi a fost colorimetrat contra unei probe standard de formazan, la lungimea de undă de 493 nm.

Valorile obţinute au fost exprimate în mg tetrazoliu redus în 30 min de 100 mg ţesut umed şi au fost calculate statistic folosind media aritmetică ($\bar{x}$), deviaţia standard (σ), testul de probabilitate (p) şi diferenţele procentuale faţă de lotul de animale martor (%).

Am ales modelul experimental descris mai sus întrucit permite o evaluare mai fidelă a relaţiei doză-efect.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute prin perfuzarea rinichiului cu cele două concentraţii de plumb şi efectul asupra dehidrogenazelor renale cercetate sînt prezentate în tabela 1 şi în figura 1.

Tabela 1

Cantitatea de 2,3,5-trifeniltetrazoliu redus din rinichiul de şobolan, perfuzat cu soluţie de acetat de plumb (mg/100 mg ţesut umed/30 min)

Doze	Substrat	
	piruvat	succinat
Martor	$\bar{x} = 4,34 \pm 0,34$ (8)	$\bar{x} = 5,18 \pm 1,28$ (8)
5 mg Pb	$\bar{x} = 4,08 \pm 1,17$ $p < 0,5$ (6,0 %) (8)	$\bar{x} = 5,04 \pm 0,57$ $p < 0,5$ (2,8 %) (8)
10 mg Pb	$\bar{x} = 2,52 \pm 0,29$ $p < 0,001$ (42,0 %) (8)	$\bar{x} = 5,16 \pm 0,88$ $p < 0,5$ (0,4 %) (8)

Notă. Cifrele din paranteze indică numărul de experienţe.

În cazul folosirii piruvatului ca substrat, activitatea piruvat-dehidrogenazei renale, enzimă NAD-dependentă, este semnificativ scăzută la concentraţia de 10 mg acetat de plumb şi nealterată în cazul perfuzării soluţiei conţinînd 5 mg acetat de plumb.

Este cunoscut faptul că procesul enzimatic catalizat de piruvat-decarboxilază este un sistem complex, care necesită prezenţa tiaminei, acidului lipoic, ATP, NAD şi a ionilor de Mg. Or, graţie afinităţii crescute pentru grupările tiol, se poate presupune că ionul de plumb reacţionează în primul rînd cu LTPP, blocînd grupările funcţionale tiol ale acidului lipoic, reacţie care ar putea avea următoarele consecinţe : scăderea acetilării acidului piruvic şi creşterea acestuia în sînge ; scăderea formării de acetil-CoA necesară în diferite reacţii de sinteză (acizi graşi, acetilcolină etc.) ; scăderea potenţialului de oxidoreducere a NAD, ca urmare a blocării activităţii NAD în regenerarea oxidativă a acidului lipoic (fig. 2).

Activitatea succinat-dehidrogenazei renale nu prezintă modificări semnificative la nici una din concentraţiile de acetat de plumb folosite.

După cum se știe, sistemul enzimatic catalizat de succinat-dehidrogenază nu este strict NAD-dependent, în constituția complexului enzimatic intrînd FAD, alt transportor de hidrogen, caz în care hidrogenul de pe substrat poate fi transportat direct de FAD, nefiind nevoie de NAD ca intermediar (fig. 3).

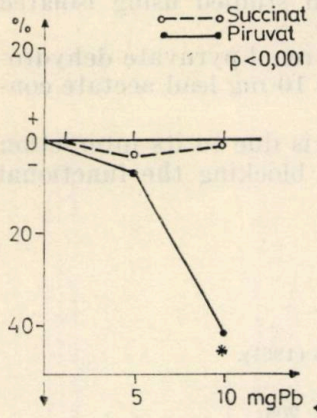


Fig. 1

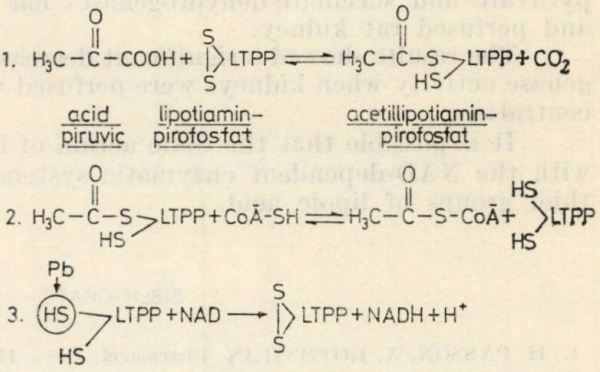


Fig. 2

Fig. 1. — Activitatea dehidrogenazelor renale sub acțiunea plumbului.

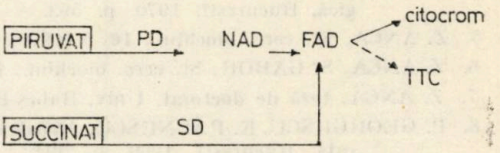


Fig. 2. — Mecanismul posibil de acțiune toxică a plumbului asupra piruvat-dehidrogenazei.

Legendă: PD - piruvat; NAD - oxidoreductază; SD - succinat; FAD - oxidoreductază; TTC - trifeniltetrazoliuclorat.

Fig. 3. — Căile de transport ale hidrogenului în cazul diferitelor substrate.

Datele privind activitatea succinat-dehidrogenazelor renale permit afirmația că, asemănător acțiunii altor metale grele (5), (6), (9), sistemul enzimatic FAD-oxidoreductazic nu este sensibil la acțiunea ionilor de plumb.

CONCLUZII

1. Studiul pe organ izolat și perfuzat privind acțiunea ionilor de plumb asupra unor dehidrogenaze renale confirmă specificitatea de acțiune a acestui metal asupra enzimelor tiol-active la nivelul rinichiului.

2. S-a demonstrat inhibarea sistemelor enzimatice de oxidoreducere NAD-dependente la nivelul parenchimului renal ca fiind unul din mecanismele de acțiune toxică a plumbului asupra rinichiului.

Prezentat la redacție
la 2 noiembrie 1981

Institutul de igienă și sănătate publică,
3400 Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

LEAD ACTION ON SOME RENAL DEHYDROGENASES

SUMMARY

The action of two concentrations (5 and 10 mg) of lead acetate on pyruvate- and succinate-dehydrogenases has been studied using isolated and perfused rat kidney.

The results showed a significant decrease of renal pyruvate-dehydrogenase activity when kidneys were perfused with 10 mg lead acetate concentration.

It is possible that the toxic action of lead is due to its interaction with the NAD-dependent enzymatic system by blocking the functional thiol groups of lipoic acid.

BIBLIOGRAFIE

1. H. PASSON, A. ROTHSTEIN, Pharmacol. Rev., **13**, 185 (1961).
2. J. EISINGER, Quarterly Rev. Biophys., **46**, 437 (1978).
3. I. POPA, *Toxicologie*, Edit. medicală, Bucureşti, 1978, p. 206.
4. N. ŞANTA, P. J. JITARIU, *Fiziologia animalelor şi a omului*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1970, p. 593.
5. Z. ANCA, St. cerc. biochim., **16**, 5 (1979).
6. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **18**, 67 (1975).
7. Z. ANCA, teză de doctorat, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1979.
8. P. GEORGESCU, E. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960, p. 394.
9. Z. ANCA, S. GABOR, *Spurenelement Symposium-Arsen*, Karl Marx Universität und Friedrich Schiller Universität, Jena, 7—11 July 1980, p. 167.

PRODUCEREA LIPAZELOR DE CĂTRE *ASPERGILLUS NIGER* CULTIVAT PE MEDII DE CULTURĂ NATURALE (SUBPRODUSE SAU MATERIALE REFOLOSIBILE ALE INDUSTRIEI ALIMENTARE)

RODICA BÎRNESCU, S. VASU *

Rezumat. S-a urmărit producerea lipazelor intra- şi extracelulare de către *Aspergillus niger* cultivat pe medii de cultură obţinute din subproduse sau materiale refolosibile ale industriei alimentare. În acest sens, s-au experimentat medii de cultură pe bază de şroturi de soia şi floarea-soarelui, melasă. Cea mai mare producţie de lipaze se realizează din lichidele de cultură obţinute din culturi de suprafaţă pe medii ce conţin şrot de floarea-soarelui şi amidon indigen comercial.

Lipazele şi esterazele constituie un grup de enzime de o deosebită importanţă atît metabolică cît şi practic aplicativă în medicină şi în industria alimentară şi uşoară (1).

Lipazele obţinute de diferite microorganisme, din care menţionăm unele tulpini de *Candida*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (2), s-au dovedit a fi mai stabile faţă de cele de origine animală, putînd deci constitui surse importante în obţinerea de preparate enzimatice lipolitice.

În lucrarea de faţă prezentăm rezultatele cercetărilor privind activitatea lipazică a culturilor de *A. niger*, obţinute pe medii de cultură ieftine din subproduse sau materiale refolosibile ale industriei alimentare.

MATERIALE ŞI METODE

S-a folosit tulpina sălbatică *A. niger* ICA-34 (colecţia ICICA — Bucureşti). S-au realizat culturi de suprafaţă şi agitate (prin agitare rotativă la 150 rot/min, 28°C) în vase Erlenmeyer de 750 ml, care conţineau cîte 150 ml mediu sterilizat prin autoclavare 30 min la 0,5 atm.

Mediile de cultură au fost mediul Raulin (3), (4) şi cele obţinute din şroturi de soia şi floarea-soarelui, melasă (5).

Mediul cu şrot de soia conţinea amidon (indigen comercial sau BDH), şrot de soia, extract de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 şi $CaCO_3$.

Mediul cu şrot de floarea-soarelui conţinea amidon comercial indigen, şrot de floarea-soarelui, extract de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 şi $CaCO_3$.

Mediul cu melasă şi cationi conţinea melasă, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, KH_2PO_4 şi ulei de soia.

Mediul cu melasă şi $K_4[Fe(CN)_6]$ conţinea melasă, $K_4[Fe(CN)_6]$, H_3PO_4, H_2SO_4 1 N, ulei de soia (5).

Fiecare mediu a fost însămînţat steril cu 6×10^6 spori.

Miceliul de diferite vîrste a fost separat de mediul de cultură prin filtrare pe pînză de nylon, apoi a fost spălat repede cu apă distilată şi uscat cu hîrtie de filtru ; lichidul de cultură a fost adus la 200 ml folosind apele de spălare ale miceliului. Miceliul uscat pe hîrtie de fil-

tru a fost folosit parţial pentru determinarea greutăţii uscate la 105°C şi pentru obţinerea omogenatului de miceliu prin mojarare cu nisip de cuarţ şi suspendare în apă (1 : 10 g/v), extragere la rece 24 de ore şi centrifugare la 4000 rot/min, 15 min (6).

Determinarea şi exprimarea activităţii lipazice. Determinarea cantitativă a activităţii lipazei s-a efectuat la pH 5,6 prin metoda titrimetrică, folosindu-se ca substanţe emulsionate insolubile în apă glicerol tributirat (TB) şi ulei de măsline (UM). Emulsionarea substratelor s-a realizat în alcool polivinilic (BDH şi indigen obţinut de la Victoria-Ucea) (7), 5 min, la omogenizatorul tip 302 (R.P.Polonă), concentraţia finală a substratului fiind de 0,1 M. Alcoolul polivinilic (1%) a fost tratat în prealabil în mediu acid (0,1 M HCl) şi prin încălzire la 75—85°C timp de o oră.

Amestecul de gliceride ca substrat în emulsie (5 ml) şi extractul enzimatic (2,5 ml) au fost incubate în prezenţa tamponului McIlvain (2,5 ml), la pH 5,6 şi temperatura optimă a enzimei de 25°C, în Erlenmeyer de 100 ml, în agitator termostat Vibroterm.

Stoparea reacţiei s-a făcut cu amestecul alcool : acetonă (1 : 1), iar titrarea acizilor graşi eliberaţi cu 0,05 N NaOH în prezenţă de fenolftaleină 0,1%(8).

Rezultatele sînt exprimate în unităţi enzimatice (U), calculate în funcţie de Δ ml NaOH folosiţi la titrare, după relaţia :

$$Y = \frac{X \cdot 500}{30}; \quad X = \text{ml NaOH probă} - \text{ml NaOH martor}$$

(U) = μmoli NaOH/ml/min/g miceliu uscat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea lipazei în culturi de *A. niger* de suprafaţă şi agitate, realizate pe medii de cultură ieftine din subproduse sau materiale refolosibile ale industriei alimentare, a fost testată cantitativ în omogenatele de miceliu şi în lichidele de cultură, rezultînd că activitatea enzimatică se găseşte atît intra- cît şi extracelular (tabela 1).

Tabela 1

Activitatea lipazei produsă de *A. niger* ICA — 34 pe mediul cu şrot de soia şi amidon BDH în culturi de suprafaţă şi agitate, la 3 zile şi două valori de pH

pH-ul mediului	Felul culturii	Greutatea uscată totală (g)	Activitatea lipazei (U)			
			intracelulară		extracelulară	
			TB	UM	TB	UM
4	de suprafaţă	1,0820	7,33	3,66	55,50	30,83
	agitată	1,1130	43,00	19,16	67,66	0
6,5	de suprafaţă	0,7694	66,83	57,66	264,00	15,50
	agitată	1,6750	79,83	2,50	22,16	30,80

Urmărind producerea lipazelor de către *A. niger* pe medii cu şrot de soia în amestec cu amidon : BDH şi indigen comercial, au rezultat activităţi lipolitice mai mari în condiţiile culturilor de suprafaţă şi ale utilizării amidonului indigen comercial.

În ceea ce priveşte pH-ul mediului, a reieşit că un pH de 6,5—6,8 este mai favorabil pentru producerea de lipaze extracelulare faţă de pH-ul

4, recomandat adesea pentru culturile de *A. niger*, mai ales pe medii sintetice, ca, de exemplu, mediul Raulin (4).

Așa cum se observă din tabela 2, mediul cu amidon comercial se comportă similar celui cu amidon BDH la pH 6,5, avînd valori apreciabile

Tabela 2

Activitatea lipazei intra- și extracelulară produsă de *A. niger* ICA-34 în culturi de suprafață și agitate, la 3 zile și două valori de pH, pe medii cu două tipuri de amidon (BDH și indigen comercial)

Tipul de amidon	pH-ul mediului	Felul culturii	Greutatea uscată totală (g)	Activitatea lipazei (U)			
				intracelulară		extracelulară	
				TB	UM	TB	UM
Indigen comercial	4	de suprafață	0,9969	152,33	0	181,83	26,60
		agitată	2,2822	0	0	0	0
	6,5	de suprafață	0,5641	369,50	164,50	94,50	189,00
		agitată	2,1707	0	0	0	0
BDH	6,5	de suprafață	0,6657	100,00	135,66	56,00	0
		agitată	2,0713	0	0	0	0

mai mari pentru lipazele din culturile de suprafață față de cele agitate, fapt ce a decis asupra utilizării amidonului indigen comercial în experiențele ulterioare.

În tabela 3 prezentăm datele referitoare la creșterea miceliului de *A. niger* și producerea de lipaze pe mediu cu șrot de soia în decurs de 10 zile.

Tabela 3

Producerea de miceliu și lipaze intra- și extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediul cu șrot de soia în culturi de suprafață și agitate în funcție de vîrstă (pH inițial 6,05)

Felul culturii	Vîrsta (zile)	Greutatea miceliului uscat (g)	Activitatea lipazei (U)			
			intracelulară		extracelulară	
			TB	UM	TB	UM
De suprafață	3	1,014	161,66	78,50	0	0
	5	0,853	78,50	47,66	198,33	0
	7	2,179	141,50	39,50	110,16	134,33
	9	2,149	156,16	0	56,16	5,83
	11	1,3704	89, 0	0	35,33	0
Agitată	3	2,944	0	0	0	0
	5	2,469	0	0	0	0
	7	0,791	103,50	23,33	0	0
	9	0,597	58,66	0	0	0
	11	0,447	0	0	40,50	0

Activitatea lipazei este mai bună în culturile de suprafaţă faţă de cele agitate, dar maximum de activitate lipolitică nu corespunde cu maximum de creştere al miceliului (7, 9 zile). Astfel, în omogenate activitatea lipazei este maximă în culturile de 3 zile, iar în lichidele de cultură după 5 zile.

Folosind cele două substrate diferite, se constată că activitatea lipolitică extracelulară, în prezenţa tributirinei, este maximă în culturile în vîrstă de 5 zile, iar în prezenţa uleiului de măsline în culturile de 7 zile.

În condiţii asemănătoare, s-a urmărit activitatea lipolitică a culturilor de *A. niger* obţinute pe un mediu ce conţinea şrot de floarea-soarelui şi amidon indigen. Rezultatele indică, de asemenea, că activitatea lipolitică este mai bună în culturi de suprafaţă faţă de cele agitate, înregistrîndu-se o creştere continuă a miceliului, cu un maxim al greutăţii uscate în ziua a 9-a. Acest maxim de creştere al miceliului corespunde însă la un minim al activităţii enzimatice atît intra- cît şi extracelulare.

Tabela 4

Producerea de miceliu şi lipaze intra- şi extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediul cu şrot de floarea-soarelui în culturi de suprafaţă şi agitate în funcţie de vîrstă (pH iniţial 6,3)

Vîrsta culturii (zile)	pH-ul mediului	Greutatea uscată a miceliului (g)	Activitatea lipazei (U)			
			intracelulară		extracelulară	
			TB	UM	TB	UM
Culturi de suprafaţă						
2	5,5	0,3362	13,66	103,33	0	0
3	5,1	0,5509	35,16	0	134,50	349,50
5	6,3	0,7603	6,33	30,33	111,66	0
7	6,2	0,8836	5,00	15,00	110,00	390,83
9	7,2	1,1301	2,33	4,66	91,33	48,33
12	6,9	1,0703	19,00	0	45,33	0
Culturi agitate						
2	5,8	3,5228	11,66	0	0	0
3	4,2	1,6668	11,33	0	66,66	124,50
5	5,5	3,1727	0	0	22,83	0
7	4,6	1,6295	50,50	0	11,66	11,66
9	5,6	2,7600	0,61	2,41	13,16	0
12	5,7	1,2237	3,83	0	0	0

În omogenate, variaţiile activităţii lipazei sînt inverse variaţiilor de pH, înregistrîndu-se la pH 5,1 (cel mai scăzut) al mediului valoarea maximă a activităţii lipazei.

În funcţie de cele două substrate folosite, activitatea intracelulară este maximă în culturile în vîrstă de 2 zile faţă de uleiul de măsline şi în culturile în vîrstă de 3 zile faţă de tributirină.

Şi în lichidele de cultură se observă aceeaşi dependenţă de pH-ul mediului, evidenţiindu-se o activitate maximă a lipazei faţă de tributirină în culturile de 3 zile, iar faţă de uleiul de măsline două valori mari, la 3 şi, respectiv, 7 zile.

De fapt, în culturile de *A. niger* obținute în prezența șrotului de floarea-soarelui, activitatea lipazei intra-, și mai ales extracelulară manifestată în prezența uleiului de măsline este mai mare decît în prezența tributirinei. Aceasta s-ar putea datora, probabil, urmelor de lipide sau componente ale acestora, rămase în șrotul de floarea-soarelui, care ar putea să acționeze ca inductori ai lipazelor. De altfel, se știe că lipazele microbiene sînt, în general, inductive și extracelulare (2).

În experiențele noastre folosind medii cu melasă și urmărind selecționarea componentelor care să influențeze producția de lipaze, ne-am stabilit două posibilități: un mediu în care am adăugat diferite săruri anorganice, prin care să avem un grup de cationi: Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, și altul în care am adăugat un complexant al acestora, $K_4[Fe(CN)_6]$ (5). Totodată, în aceste medii s-a adăugat și o cantitate mică de ulei de floarea-soarelui (2 ml $^0/_{00}$).

Tabela 5

Producerea de miceliu și lipaze pe medii cu melasă și săruri anorganice (Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}) sau melasă și adaos de $K_4[Fe(CN)_6]$ în culturi de suprafață și agitate, de diferite vîrste (pH inițial 5,85)

Felul culturii	Vîrsta culturii (zile)	pH-ul mediului	Greutatea uscată totală (g)	Activitatea lipazei (U)			
				intracelulară		extracelulară	
				TB	UM	TB	UM
Mediul cu melasă și adaos de ioni (Zn^{2+} Cu^{2+} Mg^{2+})							
De suprafață	3	4,4	3,1068	7,33	5,50	62,33	52,66
	5	3,5	9,0265	7,83	7,16	7,16	2,16
	7	3,6	3,2622	0	0	18,66	13
	10	7,5	5,5670	54,16	0	81,66	0
Agitată	3	4,5	1,4239	31,33	0	49,00	13,33
	5	3,7	5,9654	6,66	5,83	6,00	9,16
	7	4,1	2,7730	0	0	30,66	8,66
	10	4,2	4,0938	3,00	12,83	62,16	1,50
Mediul cu melasă și K_4 $[Fe(CN)_6]$							
De suprafață	3	4,1	1,2086	0	0	240,66	75,16
	5	3,8	2,3469	0	0	64,50	49,00
	7	3,7	2,0616	0	0	18,50	3,16
	10	3,6	3,4568	9,50	6,66	12,33	0
Agitată	3	7,4	0,1078	0	0	2811,00	899,50
	5	3,85	2,6687	15,00	4,50	24,83	159,00
	7	4,4	7,2740	63,33	0	0,83	0,83
	10	7,7	0,8402	21,50	0	0	0

Urmărind activitatea lipolitică a lui *A. niger* pe astfel de medii, după cum se vede în tabela 5, în general, mediul care conține și $K_4[Fe(CN)_6]$ este mai bun decît cel cu melasă și săruri anorganice în culturi de suprafață față de cele agitate, cu o excepție, și anume la cultura agitată de 3 zile, unde găsim o activitate lipolitică extracelulară de circa 10 ori mai mare decît a celorlalte culturi, atît în prezența uleiului de măsline, cît mai ales în prezența tributirinei. Se remarcă totodată că în această cultură

pH-ul mediului, după 3 zile, a crescut de la 5,85 la 7,4, în timp ce în toate celelalte probe pH-ul mediului la culturile de 3 zile a înregistrat o scădere, respectiv de la 5,85 la 4,1—4,5.

Aceste rezultate, puse în legătură cu cele obţinute pe medii cu şrot de soia (tabelele 2 şi 3) şi şrot de floarea-soarelui (tabela 4), indică efectul favorabil al pH-ului slab acid sau neutru faţă de cele acide în producerea lipazelor de către *A. niger*.

De asemenea, am constatat că, în timp ce în omogenatele culturilor de suprafaţă activitatea lipazei este mică sau chiar nulă, în lichidele de cultură activitatea lipolitică are valoarea maximă la culturile de 3 zile, cînd greutatea uscată a miceliului este minimă, iar odată cu vîrsta miceliului activitatea lipazei scade continuu.

Activitatea enzimatică a culturilor de suprafaţă de 3 zile faţă de tributirină este, în general, de trei ori mai mare faţă de cea testată în prezenţa uleiului de măsline. Mediul acesta are valori lipazice de 50—200 de ori mai mari (în culturi agitate însă) faţă de valorile maxime lipazice produse pe medii cu şrot de soia sau de floarea-soarelui.

Lipazele produse pe medii obţinute din subproduse ale industriei alimentare au fost supuse comparaţiei cu cele produse de *A. niger* cultivat pe mediul sintetic Raulin (tabela 6). Pe acest ultim mediu remarcăm

Tabela 6

Producerea de miceliu şi lipaze pe mediul sintetic Raulin în culturi de suprafaţă şi agitate, de diferite vîrste (pH iniţial 6)

Felul culturii	Vîrsta miceliului (zile)	pH-ul mediului	Greutatea uscată totală (g)	Activitatea lipazei (U)			
				extracelulară		intracelulară	
				TB	UM	TB	UM
De suprafaţă	2	3,5	0,5824	47,83	0	60,00	158,33
	3	2,65	2,3660	26,00	0	10,16	25,50
	5	3,25	3,3113	4,16	9,83	11,66	0
	7	3,3	3,0713	41,66	4,66	2,16	0
Agitată	2	4,6	0,9200	9,6	0	30,16	209,16
	3	2,65	0,9117	18,83	0	65,00	104,16
	5	2,9	1,8776	58,33	28,33	0	0
	7	4,6	3,7442	14,33	12,00	16,16	0
	10	4,6	2,2173	25,00	0	0	0

valori relativ bune ale activităţii lipolitice extracelulare, şi anume din culturile de 2 şi 3 zile; în prezenţa uleiului de măsline, valorile lipazei sînt mai mari decît în prezenţa tributirinei.

Producerea de lipaze chiar pe mediul sintetic, care nu conţine lipide, spre deosebire de mediul cu melasă sau şroturi de soia sau floarea-soarelui, unde cantităţi mici de lipide (ulei) pot să funcţioneze ca substanţe inductoare (2) în producerea lipazelor, ne determină să opinăm că pentru *A. niger* ICA-34 lipazele par să fie constitutive, producerea lor fiind favorizată de cantităţi mici de ulei adăugate mediilor.

CONCLUZII

1. Dintre mediile de cultură testate pentru producerea de lipaze de către *A. niger* ICA-34, cele mai bune s-au dovedit a fi mediul cu şrot de floarea-soarelui şi amidon indigen comercial, precum şi mediul cu melasă şi adaos de ferocianură de potasiu.

În general, culturile de suprafaţă, faţă de cele agitate, indică o activitate lipazică mai mare ; o excepţie în acest sens prezintă culturile agitate pe medii cu melasă şi adaos de ferocianură de potasiu.

2. Raportul lipaze intracelulare/lipaze extracelulare, în aceste culturi de *A. niger*, este în favoarea lipazelor extracelulare.

3. pH-ul slab acid sau cel aproape neutru al mediilor de cultură sînt favorabile producerii lipazelor în culturile de *A. niger*.

4. Activitatea lipazei faţă de uleiul de măsline este mai mare decît faţă de glicerol-tributirat în culturile de *A. niger* ICA-34 obţinut pe şrot de floarea-soarelui.

Prezentat la redacţie
la 30 septembrie 1981

Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti
şi
* *Universitatea Galaţi*

PRODUCTION OF LIPASES BY *ASPERGILLUS NIGER* GROWN ON NATURAL CULTURE MEDIA (BY-PRODUCTS OR WASTES FROM FOOD INDUSTRY)

SUMMARY

The production of intra- and extracelular lipases by fungus *Aspergillus niger* grown on culture media derived from wastes or by-products of food industry was followed.

For that reason media containing mainly sun flower and soy-bean groats as well as molasses were used in various experiments.

The highest production of lipases was obtained in culture liquids by static cultures on media containing mainly sun flower groats and usual starch.

BIBLIOGRAFIE

1. KHEM M. SHAHANI, *Enzymes in food processing*, ed. Gerald Reed, London, 1975, p. 181.
2. J. FUKUMOTO, M. IWAI, Y. TSUJISAKA, J. gen. appl. Microbiol., **9**, 3 (1963).
3. A. JORGENSEN, *Mikroorganismen der Gärungsindustrie*, Verlag Hans Carol, Nürenberg, 1956, p. 522.
4. S. VASU, St. cerc. biochim., **6**, 72 (1963).
5. J. SMITH, D. R. BERRY, *The filamentous fungi*, vol. I, Edward Arnold, Ltd, London, 1975, p. 152.
6. S. VASU, *Enzime pectolitice din A. niger*, teză de doctorat, 1973.
7. M. DIMONIE, C. OPRESCU, J. ROGOZ, D. EMIL, M. COROBEA, Brevet nr. 58177/1971, OSIM R.S.R.
8. G.L. MILLER, R. BLUM, W. E. GLENNON, A.L. BARTON, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).

DEGRADAREA β-GLUCOZIDAZEI DE CĂTRE CATEPSINA B_1

ELENA GANEA, MARIA ANDRAŞ

Rezumat. Degradarea β-glucozidazei din rinichi de şobolan cu catepsină B_1 din ficat uman s-a urmărit prin metode enzimatice, electroforetice şi imunochimice. Activitatea enzimatică a β-glucozidazei tratate cu catepsină B_1 suferă o scădere lineară în timp (0—8 ore). Disc-electroforeza în gel de PAA şi metodele imunochimice arată că în primele două ore de incubare au loc modificări ale moleculei substrat în vederea atingerii conformaţiei optime pentru atacul proteolitic.

Este cunoscut faptul că funcţia principală a lizozomilor este legată de digestia intracelulară a diferitelor substrate intra- şi extralizozomale. Pe lîngă hidrolazele proprii sistemului proteolitic, în lizozomi există şi o adevărată colecţie de hidrolaze ce acţionează specific asupra substratelor de natură glucidică (polizaharide sau partea glucidică a glicoproteinelor) (1). Prezenţa β-glucozidazei în lizozomi a fost semnalată în ficatul de şobolan (2) şi în sistemul nervos (3), în timp ce în rinichiul de şobolan pare să aibă o localizare extralizozomală (4). Repartiţia β-glucozidazei în afara lizozomilor poate fi legată de unul din aspectele generale ale proteolizei la care contribuie lizozomii, şi anume selectivitatea. Astfel, pe lîngă moleculele complet degradate în lizozomi, există molecule selective pregătite extralizozomal, suferind o clivare limitată, în vederea scindării lor complete în lizozomi (5). Situată intra- şi extralizozomal, β-glucozidaza este ea însăşi supusă degradării intralizozomale. Viteza de turnover şi tipul de celule în care are loc degradarea sînt influenţate de structura părţii glucidice a glicoproteinelor (6), aceasta oferindu-le o anumită protecţie împotriva atacului catepsinelor lizozomale. Structura componentelor glucidice din molecula β-glucozidazei nu se cunoaşte încă. Willcox şi Renwick (7) au relatat numai că ea nu conţine acid neuraminic. Ca urmare, ţinînd seama de tipurile de structuri oligozaharidice din moleculele glicoproteinelor (8), putem presupune că β-glucozidaza aparţine clasei avînd manoză sau N-acetilglucozamină în poziţia terminală. Din această clasă fac parte, de altfel, majoritatea glicozidazelor lizozomale (9), clearance-ul lor fiind mediat de celulele hepatice sinusoidale (6).

Într-o lucrare anterioară (10), în cadrul studiului reducerii antigenicităţii enzimelor prin modificarea structurii lor, s-a urmărit, printre altele, şi comportarea β-glucozidazei din *Phaseolus vulgaris* la tripsinoliză limitată. În ultimii ani, interesul cercetătorilor din domeniul degradării intracelulare s-a îndreptat din ce în ce mai mult către proteoliza limitată, care produce activarea sau modificări ale moleculelor substrat, ce iau astfel parte la o cascadă de reacţii.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea şi purificarea β-glucozidazei. β-Glucozidaza s-a izolat şi purificat din rinichi de şobolan mascul, adult, după metoda lui Robinson şi Price (4), care cuprinde două etape: cromatografie pe DEAE-celuloză şi gel-filtrare pe Sephadex G-75.

Determinarea activităţii enzimatice a β-glucozidazei s-a efectuat după metoda lui Barrett (11) şi se bazează pe estimarea spectrofotometrică a p-nitrofenolului eliberat din glicozidul substrat în condiţii standard. Activitatea enzimatică s-a exprimat în μmoli p-nitrofenol/ml.

Prepararea şi purificarea catepsinei B_1. Catepsina B_1 s-a preparat din ficat uman după metoda lui Barrett (12). Purificarea s-a realizat după aceeaşi metodă şi a constat în cromatografie pe CM-celuloză şi gel-filtrare pe Sephadex G-75.

Determinarea activităţii catepsinei B_1. Activitatea enzimatică a catepsinei B_1 s-a testat prin metoda lui Barrett (13) pe substrat BANA (N-benzoil-D,L,arginin-2-naftilamidă) în prezenţa EDTA 2 mM şi a cisteinei 1mM la pH 6.

Hidroliza β-glucozidazei de către catepsina B_1. β-Glucozidaza a fost tratată cu catepsină B_1 în raport 1/50 (E/S) şi incubată timp de 15 şi 30 min, 1, 2, 4 şi 8 ore la 37°C, în prezenţă de EDTA 2 mM şi ditiotreitol (DTT) 2 mM. Comportarea β-glucozidazei la atacul catepsinei s-a urmărit prin disc-electroforeză în gel de PAA, dublă difuzie radială, imunoelectroforeză, imunoelectrodifuzie şi prin determinarea spectrofotometrică a activităţii enzimatice a β-glucozidazei.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a efectuat după metoda lui Davis (14). Evidenţierea benzilor proteice s-a făcut prin colorare cu Amidoschwartz şi spălare cu acid acetic 3%.

Obţinerea antiserului anti-β-glucozidaza s-a realizat pe un iepure prin injectarea intradermică, în două prize la interval de 14 zile, a unui amestec 1/1 soluţie β-glucozidază (0,7 mg proteină)/ adjuvant Freund complet. După 10 zile de la cea de-a doua injecţie s-a efectuat singerarea parţială; titrul de anticorpi s-a dovedit a fi bun şi s-a practicat singerarea totală.

Dubla difuzie radială s-a efectuat după metoda lui Ouchterlony (15) în gel de agaroză 1% în ser fiziologic.

Imunoelectroforeza s-a făcut după metoda lui Grabar (16) în gel de agaroză 1% în tampon veronal.

Imunoelectrodifuzia s-a efectuat după metoda lui Laurell (17) în gel de agaroză 1% în tampon veronal conţinînd antiser anti-β-glucozidază în raport 1/10.

Proteinele separate prin metodele imunochimice menţionate s-au colorat cu o soluţie de Coomassie Brilliant Blue p.a. în etanol-acid acetic-apă timp de10 min.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute pe parcursul etapelor de preparare şi purificare a β-glucozidazei după metoda lui Robinson şi Price sînt prezentate în tabela 1. După cum se vede, randamentul realizat de noi este foarte mic; ca urmare, a fost necesară repetarea de cîteva ori a experimentului în scopul obţinerii unei cantităţi suficiente de enzimă.

Tabela 1

Etapele de purificare a β-glucozidazei din rinichi de şobolan (9 g ţesut umed)

Etapa	Conc. prot. (mg/ml)	Total mg prot.	Activ. enz. (μmoli p-N-fenol/ml)	Activ. specifică (μmoli/mg prot.)
Extract glicozidazic (omogenat)	5,27	253	1,01	0,2
Cromatografie pe DEAE-celuloză	3,720	74,4	0,86	0,3
Gel-filtrare pe Sephadex G-75	1,375	11	1,90	1,4

Interrelaţia dintre cele două tipuri de hidrolaze (glicozidaze şi proteaze) s-a urmărit prin incubarea β-glucozidazei cu catepsină B_1 în condiţiile descrise în capitolul „Material şi metode". Rezultatele incubării au fost interpretate în funcţie de modificările proprietăţilor electroforetice, enzimatice şi antigenice ale amestecului de incubare.

Preparatul purificat de noi conţinînd β-glucozidază, proteină acidă cu greutate moleculară mică, 40 000—50 000 (11), se comportă la electroforeză în gel de PAA aşa cum arată figura 1, *a*. Se observă un grup de benzi catodice de intensitate slabă, datorate probabil impurităţilor prezente încă în preparat, şi două benzi anodice, datorate β-glucozidazei, pe care le vom nota : A = banda cea mai anodică şi B = cealaltă bandă, avînd o grosime mai mare. Una din cele două benzi s-ar mai putea datora, deşi este puţin probabil, şi unei alte enzime, β-xilozidaza, a cărei activitate însoţeşte β-glucozidaza în unele preparate de origine vegetală şi animală (18). Noi nu am testat diferenţiat aceste activităţi neavînd substrate specifice pentru evidenţierea activităţii în gel de PAA. Totuşi, deoarece ambele activităţi menţionate sînt exprimate uneori de aceeaşi enzimă, datorită unei lipse de specificitate pentru C_4 şi C_6, considerăm ambele benzi proteice datorate β-glucozidazei.

Incubarea β-glucozidazei cu catepsină B_1 produce modificări ale moleculei substrat exprimate electroforetic aşa cum se vede în figurile 1 şi 2.

Ca martori s-au considerat probele de β-glucozidază incubate în prezenţa activatorilor (EDTA, DTT) pe perioade de timp identice cu cele ale incubării probelor ce conţin şi catepsină B_1. Probele incubate numai cu activatori prezintă la electroforeză o scădere a intensităţii celor două benzi proteice cu apariţia unor benzi suplimentare (fig. 1, *b*, *d*, *f*), ceea ce se explică prin desfacerea în prezenţa DTT a unor legături disulfidice existente probabil în molecula β-glucozidazei. Rolul legăturilor disulfidice este, după cum se ştie, de a stabiliza proteinele, ceea ce apare cu atît mai important în mediul intralizozomal, unde deplierea unei părţi a lanţului polipeptidic poate conduce cu uşurinţă la distrugerea proteolitică a acestuia (19). În prezenţa catepsinei, după cum se vede, acest fenomen este împiedicat. De aceea, pentru simplificarea explicaţiei vom analiza numai electroforegramele β-glucozidazei incubate cu catepsină B_1 şi activatori, diferite perioade de timp, condiţiile de incubare fiind aceleaşi.

După 15 min de incubare se observă o deplasare anodică a celor două benzi, banda B avînd o intensitate mult mai slabă (fig. 1, *c*) ; după 30 min de incubare, cele două benzi migrează şi mai mult spre anod, dovedind atît modificări ale încărcării electrice, cît şi de greutate moleculară, produse în urma atacului catepsinei B_1 (fig. 1, *e*). Interesant este însă ceea ce se petrece după o oră şi două ore de incubare. După o oră (fig. 2, *b*), banda A nu este sensibil modificată faţă de aspectul de la 30 min, dar apar două benzi B cu viteze de migrare mai mari decît viteza benzii corespunzătoare din proba netratată (fig. 2, *a*) şi cu o intensitate mai slabă ; aceste două benzi pot proveni din scindarea benzii B. Ele au însă viteze de migrare mai mici decît benzile B ale probelor incubate 15 min (fig. 1, *c*) şi 30 min (fig. 1, *e*), ceea ce ar sugera prezenţa unor produşi de agregare la o oră de incubare (fig. 2, *b*). Într-adevăr, se ştie că proteinele agregate sînt rapid elimi-

nate din circulație, căci, pe lîngă grupările existente la suprafața monomerului, prin asociere apar noi grupări de legare de receptori. Grupările care în molecula nativă sînt mascate în interior pot fi aduse la suprafață prin denaturarea ce precedă formarea unui agregat (20). După două ore de incubare (fig. 2, *c*) apare o singură bandă B, mai intensă, iar banda A are o migrare mai puțin anodică decît la o oră. Acest aspect ar sugera o intensificare a procesului de agregare. La 4 ore de incubare (fig. 2, *d*), aspectul electroforetic este similar cu cel de la două ore, cu deosebirea că intensitatea ambelor benzi scade, ceea ce se poate datora acțiunii de degradare a catepsinei B_1. La 8 ore de incubare (fig. 2, *e*), banda B dispare, banda A avînd o migrare și mai anodică, ca urmare a modificării încărcării sale electrice, precum și a greutății moleculare, rezultat al acțiunii catepsinei B_1.

Disc-electroforeza în gel de PAA ne conduce deci la următoarele observații :

a. Cele două benzi proteice datorate β-glucozidazei se comportă diferit la atacul catepsinei B_1, banda B dovedind o susceptibilitate mai mare decît banda A. Se pare că molecula proteinei substrat este constituită din două porțiuni : una mai rezistentă, cealaltă mai puțin rezistentă la proteoliză. O explicație similară este dată de autorii unei lucrări anterioare (21) în cazul glicoproteinelor din mucusul gastric, care prezintă o porțiune conținînd glucide, rezistentă la proteoliză, și alta fără glucide, susceptibilă la degradarea proteolitică ; aceasta din urmă conține legături disulfidice, care leagă unitățile moleculei între ele. Pe lîngă aceste observații, comportarea în prezența DTT-ului ne face să presupunem că β-glucozidaza ar avea o structură de tipul glicoproteinelor din mucus.

b. Degradarea β-glucozidazei de către catepsina B_1 constă dintr-o serie de fenomene intermediare de depliere și agregare pînă cînd molecula atinge conformația optimă atacului proteazic. În cazul nostru, această conformație s-ar întîlni după două ore de incubare.

Am văzut comportarea β-glucozidazei ca proteină la degradarea cu catepsină B_1 ; în cele ce urmează vom arăta în ce măsură este afectată activitatea ei enzimatică prin tratamentul menționat. Tabela 2 prezintă rezultatele activității β-glucozidazei pe substrat sintetic la diferite intervale de incubare cu catepsină B_1.

Tabela 2

Activitatea enzimatică a β-glucozidazei tratate cu catepsina B_1

Nr. crt.	Probă	Timp incubare (min)	E_{420} nm	Activ. enzimat. (μmoli p-N-fenol /ml)
1	β-glucozidază (β-Glu)	0	0,105	1,05
2	β-Glu+DTT+EDTA	15	0,080	0,85
3	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	15	0,090	0,95
4	β-Glu+DTT+EDTA	30	0,080	0,85
5	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	30	0,085	0,90
6	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	60	0,070	0,60
7	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	120	0,065	0,56
8	β-Glu+DTT+EDTA	240	0,055	0,52
9	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	240	0,060	0,54
10	β-Glu+DTT+EDTA+catepsină B_1	480	0,055	0,62

Comparînd probele incubate în prezenţa catepsinei B_1 cu martorii lor (β-glucozidază + DTT + EDTA), observăm o scădere a activităţii, fenomen asemănător cu cel întîlnit la disc-electroforeza în gel de PAA, unde urmăream β-glucozidaza ca proteină. Desfacerea legăturilor disulfidice afectează, deci, într-o anumită măsură activitatea enzimatică a β-glucozidazei. După incubarea cu catepsină B_1, activitatea glucozidazică scade liniar pînă la 8 ore, cînd se mai păstrează încă 50% din activitatea iniţială. Această activitate aparţine probabil benzii A, care rămîne încă prezentă şi după 8 ore de hidroliză, cînd banda B dispare aproape complet (fig. 2, *e*).

Date asemănătoare au obţinut recent Holzman şi colab. (22), care au demonstrat inactivarea luciferazei de către tripsină şi chimotripsină. Luciferaza este o enzimă formată din două subunităţi : α (G. M. 42 000) şi β(G. M. 37 000), care sub influenţa proteazelor menţionate suferă o clivare numai la nivelul subunităţilor α. Hidroliza unui număr mic de legături peptidice situate în această regiune duce la o modificare în centrul activ, avînd ca urmare scăderea activităţii şi o uşoară depliere a moleculei, fără modificări structurale evidente.

Studii recente de proteoliză limitată a unor enzime arată că modificarea activităţii enzimatice este în funcţie de relaţia dintre locul din moleculă în care se produce scindarea proteolitică şi poziţia sau /şi dimensiunile zonei catalitic active.

Astfel, proteoliza limitată de deoxinucleotidiltransferazei de către o protează izolată din *Staphylococcus aureus* are ca urmare scindarea unui

---

Fig. 1. — Disc-electroforeza în gel de PAA a β-glucozidazei tratate cu catepsină B_1.

a, β-glucozidază (β-Glu)	0
b, β-Glu + DTT + EDTA	15 min
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	15 min
d, β-Glu + DTT + EDTA	30 min
e, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	30 min
f, β-Glu + DTT + EDTA	4 ore
g, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	4 ore

Fig. 2. — Disc-electroforeza în gel de PAA a β-glucozidazei tratate cu catepsină B_1.

a, β-glucozidază	0
b, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	1 oră
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	2 ore
d, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	4 ore
e, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	8 ore

Fig. 3. — Dubla difuzie radială în gel de agaroză a probelor de β-glucozidază tratată cu catepsină B_1, în raport 1/50.

a, β-glucozidază	0
b, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	8 ore
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	2 ore
d, β-Glu + DTT + EDTA	4 ore
e, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	1 oră
f, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	4 ore

Fig. 4. — Imunoelectroforeza în gel de agaroză 1%, tampon veronal, pH 8,6.

a, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	1 oră
b, β-Glu + DTT + EDTA	4 ore
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	2 ore

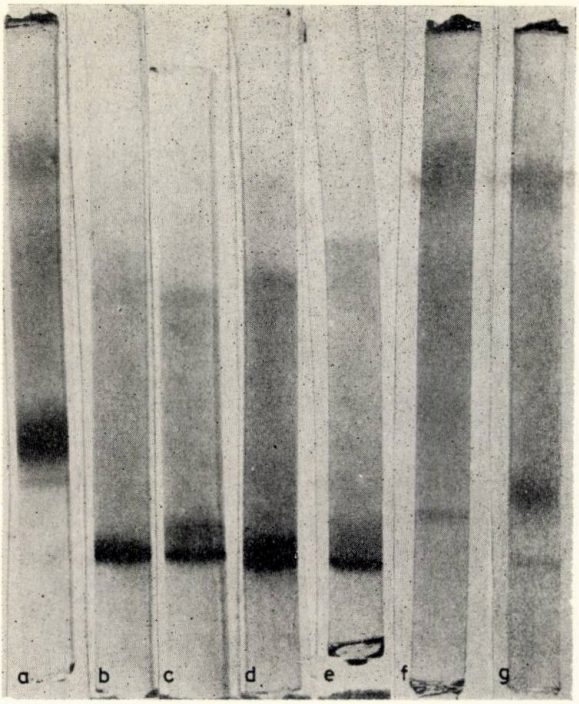


Fig. 1

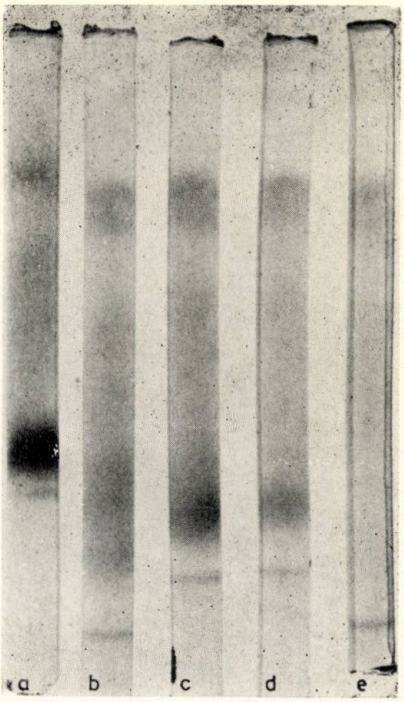


Fig. 2

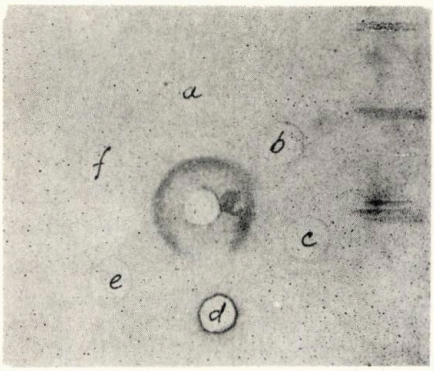


Fig. 3

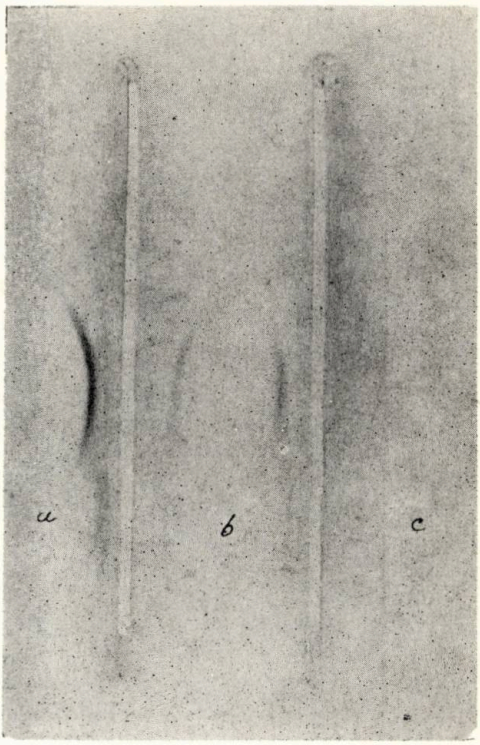
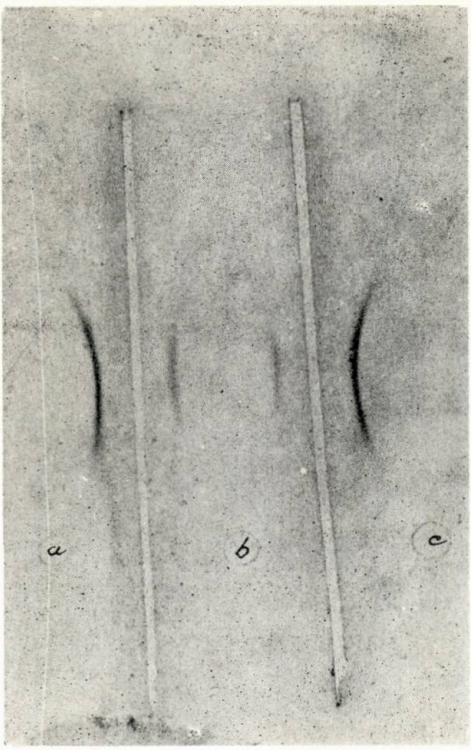


Fig. 4 ⟶



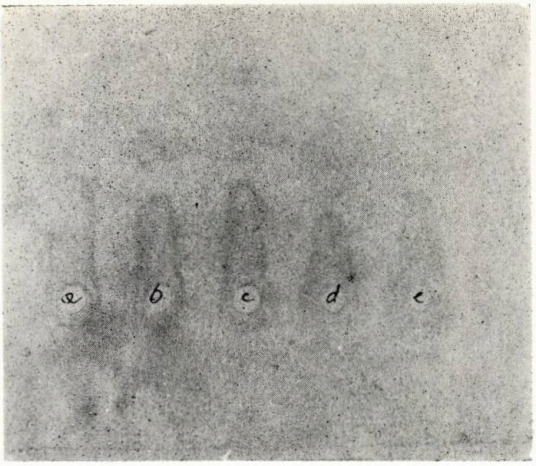


Fig. 6

← Fig. 5

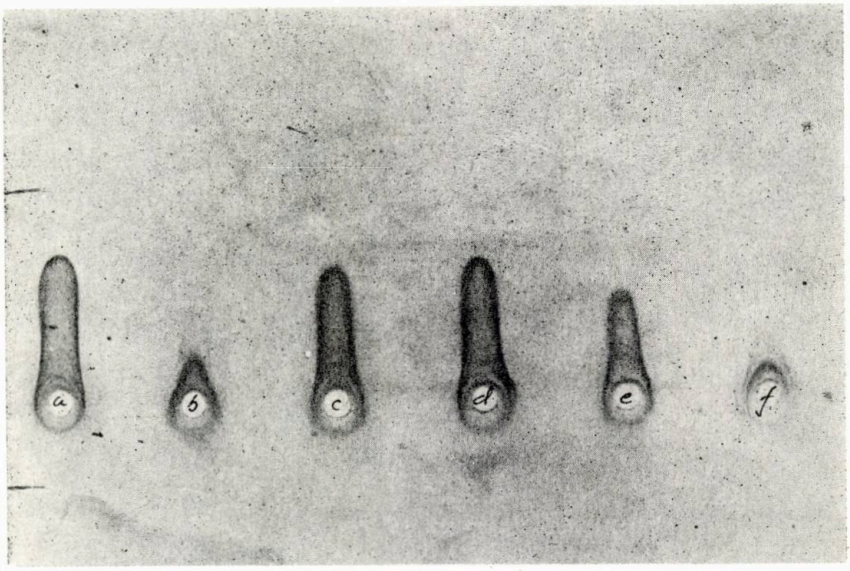


Fig. 7

fragment polipeptidic de 25 000 G. M. (reprezentînd aproximativ 70% din totalul G. M. a subunităților mari, β), fără alterarea proprietăților catalitice (23). Autorii deduc astfel că proprietățile catalitice ale enzimei există pe un domeniu polipeptidic de greutate moleculară mică, restul moleculei servind probabil numai pentru recunoașterea, transportul sau modificările posttranslaționale necesare unui rol fiziologic necunoscut.

Spre deosebire de cele menționate, proteoliza limitată cu subtilizină a fructozo-1,6-difosfatazei din cloroplaste produce o pierdere parțială a activității enzimatice, cu toate că subtilizina a scindat un fragment polipeptidic cu greutate moleculară de numai 40 000, enzima rămînînd tetramerică și după tratament.

Rezultatele anterioare cu β-glucozidază din *Phaseolus vulgaris* tratată cu tripsină (10) au fost diferite de cele prezente, în sensul că activitatea enzimatică creștea după 20 min de incubare, după care scădea pînă la o oră, înregistrînd apoi o nouă creștere pînă la două ore. Aceste oscilații exprimînd modificări ale conformației moleculei enzimei vegetale nu le întîlnim la enzima din rinichi de șobolan, la care activitatea enzimatică scade continuu în timpul degradării cu catepsină B_1. Diferența de comportare se poate datora atît structurii diferite, cît și acțiunii specifice a celor două tipuri de proteaze : tripsină și catepsina B_1.

Un alt grup de experimente a urmărit modificarea proprietăților antigenice ale β-glucozidazei tratate cu catepsină B_1. Dubla difuzie radială (fig. 3) și imunoelectroforeza (fig. 4 și 5) nu arată modificări esențiale ale antigenicității substratului la 15, 30, 60 și 120 min de incubare cu catepsină B_1. La imunoelectroforeză se observă o scădere marcantă a intensității liniilor de precipitare corespunzătoare β-glucozidazei incubate cu activatori în absența catepsinei B_1 (fig. 4, *b* ; 5, *b*) ; la dubla difuzie radială, linia de precipitare a dispărut aproape complet (fig. 3, *d*). Rezultă deci că punțile disulfidice sînt absolut necesare exprimării antigenicității moleculei, ca de altfel și activității ei enzimatice, după cum am arătat

---

Fig. 5. — Imunoelectroforeza în gel de agaroză 1%, tampon veronal, pH 8,6.

a, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	4 ore
b, β-Glu + DTT + EDTA	4 ore
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	8 ore

Fig. 6. — Imunoelectrodifuzia în gel de agaroză 1% conținînd anti-β-glucozidază, în raport 1/10.

a, β-Glu	0
b, β-Glu + DTT + EDTA	15 min
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	15 min
d, β-Glu + DTT + EDTA	30 min
e, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	30 min

Fig. 7. — Imunoelectrodifuzia în gel de agaroză 1% conținînd anti β-glucozidază, în raport 1/10.

a, β-Glu	0
b, β-Glu + DTT + EDTA	4 ore
c, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	1 oră
d, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	2 ore
e, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	4 ore
f, β-Glu + DTT + EDTA + catepsină B_1	8 ore

anterior. La 4 ore de incubare cu catepsină B_1 se obţin modificări decelabile numai prin imunoelectroforeză, şi anume apariţia în plus a unor arcuri de precipitare cu viteză de migrare mai mică, provenite probabil din denaturarea moleculei. După 8 ore de incubare, prin aceeaşi metodă se evidenţiază un arc de precipitare cu antigenicitate net scăzută. La imunodifuzia radială se obţine doar la 8 ore o modificare a liniilor de precipitare prin apariţia unei linii cu viteză de difuzie mai mică decît cele ale probelor incubate mai puţin de 8 ore. De fapt, această linie se observă la o oră şi două ore, unde are însă o intensitate mult mai mică. Ea ar putea fi datorată unor produşi de denaturare agregaţi, care nu au fost evidenţiaţi prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Imunoelectrodifuzia de tip Laurell este ilustrată în figurile 6 şi 7. Se observă prezenţa mai multor arcuri de precipitare cu viteze de migrare diferite în gelul de agaroză conţinînd ser anti-β-glucozidază. Din nou, prezenţa DTT în mediul de incubare în absenţa catepsinei B_1, prin scindarea punţilor disulfidice, produce modificări ale conformaţiei moleculei, care au ca urmare scăderea antigenicităţii acesteia. Vom lua în considerare, ca şi la experimentele anterioare, numai probele cu catepsină B_1 incubate diferite intervale de timp, măsurînd înălţimea arcului de precipitare cu cea mai mare viteză de migrare. Raportînd înălţimea arcului de precipitare format prin migrarea electroforetică a probelor incubate cu catepsină B_1 la înălţimea arcului corespunzător β-glucozidazei native, obţinem următoarele rezultate :

PROBA	% din înălţ. arc. precip. β-Glu nativă
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 15 min	94,1
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 30 min	85,3
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 1 oră	90
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 2 ore	95
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 4 ore	75
β-glucozidază + catepsină B_1 + EDTA + DTT — 8 ore	25

După 8 ore de incubare, se obţine o scădere a antigenicităţii β-glucozidazei de 75 %. Această scădere însă nu se desfăşoară liniar, ca în cazul activităţii enzimatice, ci suferă variaţii asemănătoare cu cele de la disc-electroforeză în gel de PAA. Metoda imunoelectrodifuziei este, desigur, mai sensibilă decît dubla difuzie radială şi imunoelectroforeza, sesizînd simultan atît proprietăţile electrice, cît şi cele de difuzie simplă. Rezultatele arată deci o scădere a principalului arc de precipitare după 15 şi 30 min de incubare, începînd să crească după o oră pînă la două ore, ceea ce demonstrează expunerea determinanţilor antigenici prin modificările moleculei suferite în prezenţa catepsinei B_1. La 4 ore, antigenicitatea scade sensibil, iar la 8 ore dramatic, ca urmare a desfăşurării normale a reacţiei de degradare proteolitică. La β-glucozidaza din *Phaseolus vulgaris*, prin această metodă, s-a înregistrat o creştere a înălţimii piscului de precipitare după 20 min de incubare (10). Cumulate cu modificările obţinute la alte glicoproteine (lactoferina, β-N-acetilglucozaminidaza), autorii explică astfel de rezultate prin faptul că în primele minute ar avea

loc o interacţiune de tipul proteină-proteină şi apoi proteină-enzimă de degradare. Această explicaţie ar putea fi valabilă şi în cazul nostru, cu deosebirea că timpul diferă (două ore de incubare fiind trecerea de la un tip de interacţiune la celălalt).

CONCLUZII

1. β-Glucozidaza din rinichiul de şobolan prezintă o reducere a activităţii enzimatice şi a proprietăţilor antigenice în prezenţa ditiotreitolului, demonstrînd importanţa punţilor disulfidice pentru menţinerea integrităţii moleculei necesară exprimării acestor funcţii.

Catepsina B_1 protejează β-glucozidaza de acţiunea DTT-ului.

2. Aspectul electroforetic al degradării β-glucozidazei de către catepsina B_1 ilustrează prezenţa a două benzi proteice, avînd susceptibilităţi diferite la atacul proteolitic.

În intervalul 0—2 ore au loc modificări ale conformaţiei moleculare (deplieri, agregări) în vederea atingerii conformaţiei cu accesibilitate maximă la degradarea cateptică.

3. Activitatea enzimatică a β-glucozidazei suferă o scădere liniară în urma acţiunii catepsinei B_1.

4. Proprietăţile antigenice se modifică diferit de cele enzimatice în primele două ore de incubare, demonstrînd că cele două situsuri (catalitic şi antigenic) sînt diferite.

Exprimăm mulţumiri tehnicienei Doina Popa pentru eficienta asistenţă tehnică acordată.

Prezentat la redacţie
la 8 decembrie 1981

Institutul de ştiinţe biologice,
77748, Bucureşti 17, Splaiul Independenţei nr. 296

β-GLUCOSIDASE DEGRADATION BY CATHEPSIN B_1

SUMMARY

Rat kidney β-glucosidase degradation by cathepsin B_1 from the human liver was studied by enzymatic, electrophoretical and immunochemical methods. The enzymatic activity of cathepsin B_1 treated β-glucosidase shows a linear decrease with the time (0—8 hours). By using disc PAA gel electrophoresis and immunochemical methods, we were able to demonstrate changes occurring in the substrate molecule which enables the subsequent proteolytic attack.

BIBLIOGRAFIE

1. N.N. ARONSON, Jr., C. DE DUVE, J. Biol. Chem., **243**, 4569 (1968).
2. P. WILLCOX, G.C. RENWICK, Eur. J. Biochem., **73**, 579 (1977).
3. E. ROBINS, H.E. HIRSCH, J. Biol. Chem., **243**, 4253 (1968).

4. D. ROBINSON, R.G. PRICE, N. DANCE, Biochem. J., **102**, 525 (1967).
5. R.T. DEAN, în *Biological functions of proteinases*, sub red. H. HOLZER, H. TSCHESCHE, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979, p. 49.
6. H. SCHLESINGER, J.S. RODMAN, T.W. DOEBBER, PH.D. SZAHL, Y.C. LEE, C.P. STOWELL, T.B. KUHLENSCHMIDT, Biochem. J., **192**, 597 (1980).
7. P. WILLCOX, G.C. RENWICK, Eur. J. Biochem., **73**, 579 (1977).
8. CECILIA MOTAŞ, St. cerc. biochim., **23**, 87 (1980).
9. P. STAHL, P.H. SCHLESINGER, J.S. RODMAN, T.W. DOEBBER, Nature, **264**, 86 (1976).
10. C. MOTAŞ, Contract M.E.I., 1979.
11. A.I. BARRETT, în *Lysosomes*, sub red. J.T. DINGLE, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-London, 1972, p. 116.
12. A.I. BARRETT, Biochem. J., **131**, 809 (1973).
13. A.I. BARRETT, Anal. Biochem., **47**, 280 (1972).
14. B.I. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
15. O. OUCHTERLONY, Prog. in Allergy, **1**, 5 (1958).
16. P. GRABAR, în *Immunological methods*, sub red. A.F.I. ACKROYD, Blackwell Publ., Oxford, 1964, p. 79.
17. C.E. LAURELL, Anal. Biochem., **15**, 45 (1966).
18. J. CONCHIE, A.L. GELMAN, G.A. LEVVY, Biochem. J., **103**, 609 (1967).
19. J.M.W. BOUMA, în *Enzyme therapy in lysosomal storage diseases*, sub red. J.M. TAGER, G.J.M. HOOGHWINKEEL, W. TH. DAEMS, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-London, 1974, p. 197.
20. J.M. STARK, J.K. SPITZNAGEL, J. Immunol., **108**, 800 (1972).
21. M. SCAWEN, A. ALLEN, Biochem. J., **163**, 363 (1977).
22. T.H. HOLZMAN, P.L. RILEY, T.O. BALDWIN, Arch. Biochem. Biophys., **205**, 564 (1980).
23. M. DEIBEL, M.S. COLEMAN, Arch. Biochem. Biophys., **202**, 414 (1980).

OBŢINEREA DE ENERGIE DIN PLANTE ACVATICE REZULTATE CA SUBPRODUS ÎN EPURAREA APELOR UZATE*

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL

Rezumat. Se dă o scurtă privire de ansamblu asupra preocupărilor din ţara noastră în domeniul valorificării ca sursă neconvenţională de energie a plantelor acvatice rezultate ca subprodus în epurarea apelor reziduale. Sînt prezentate unele date referitoare la biomasa obţinută prin cultivarea de micro- şi macrofite pe diferite tipuri de ape reziduale (industriale, orăşeneşti, de la complexe zootehnice). Se menţionează totodată şi unele rezultate preliminare privind formarea gazului metan din subproduse.

Domeniul apelor uzate, rezultat al dezvoltării industriale, a adus, mai ales în ultimii ani, tehnologii care îmbină o gamă largă de procedee fizice, chimice şi biologice.

Iniţial, urmărind randamente ridicate de epurare, tehnologiile au trecut inevitabil la problema importantă a valorificării deşeurilor rezultate sau a subproduselor. Cercetările efectuate pe plan mondial au luat în considerare posibilitatea obţinerii de energie pornind de la nămol primar, rezultat în treapta de decantare mecanică. Gazul de fermentare obţinut în metantancuri a permis utilizarea sa ca energie calorică pentru încălzirea clădirilor aferente staţiilor de epurare, precum şi a instalaţiilor de fermentare (1). În cadrul epurării apelor, procedeele clasice au permis obţinerea nămolului secundar, care a constituit elementul activ pentru fermentare şi sursă de proteină. Conţinutul bogat în elemente nutritive al diverselor categorii de ape uzate a dus la folosirea plantelor acvatice ca principale elemente epuratoare. Cercetările efectuate în R. F. Germania, România, Franţa, S. U. A., India (2), (3), (4), (5) au arătat că aceste plante acvatice prezintă capacitatea de a metaboliza o serie de poluanţi şi a-i transforma în elementele necesare creşterii şi dezvoltării lor. Atît microfitele cît şi macrofitele pot utiliza cantităţi impresionante de poluanţi ca bază trofică, generînd o masă vegetală demnă de comparat cu cele mai productive bazine naturale. Cercetările au demonstrat că pe baza conversiei se obţin ca subproduse mase vegetale cu conţinut nutritiv ridicat (5), ca, de pildă, substanţe azotate 56,7 %, proteine totale 50,7—52 %, proteine digestibile 41 %, glucide 36 %, lipide 6,9 %.

În cazul prezenţei unor substanţe toxice acumulate — şi trebuie să recunoaştem că în majoritatea apelor uzate industriale şi orăşeneşti

* Comunicare prezentată la Institutul de radiochimie din Innsbruck, Austria, în cadrul întîlnirii de lucru bilaterale dintre România şi Austria în problema „Energie din biomasă", 26 februarie — 2 martie 1979.

găsim asemenea substanțe poluante — , aceste plante nu mai pot constitui o sursă de proteină, ci numai o sursă de energie obținută prin fermentare (6).

Introducerea în România, ca de altfel și în alte țări — ne referim mai ales la epurările apelor sulfocianurice, cianurice și fenolice, la șlamuri radioactive etc. — , la scară pilot sau industrială, a unor asemenea procedee de epurare cu plante conduce la posibilitatea obținerii de biomasă cantitativ importantă. Spre deosebire de alte țări, România a mers în cercetările ei pe linia elaborării de procedee și instalații climatizate de epurare cu plante, instalații care ocupă spații reduse, dar care pot duce la cantități mari de biomasă generatoare de energie (2), (3), (6).

MATERIAL ȘI METODE

Pentru experimentările de laborator s-au utilizat ca material vegetal de însămînțare următoarele alge : *Chlorella vulgaris*, *Cladophora*, *Scenedesmus*, *Spyrogira*, *Oedeogonium*, obținute din apa iazurilor de epurare existente în stațiile orășenești. Speciile au fost trecute mai întîi pe medii nutritive și apoi în vase de experiență.

Pentru microfite au fost utilizate două tipuri de vase experimentale, și anume unele de tip acvariu cu capacități cuprinse între 10 și 30 l, iar altele pe sistemul modelelor de epurare din plastic, de concepție proprie. Diluțiile s-au realizat din ape uzate orășenești, ape uzate agrozootehnice, ape uzate cianurice, fenolice, ape din industria chimică.

Dintre macrofite s-au studiat acele specii de plante acvatice frecvente în bălțile și iazurile din țară, recoltate în diverse stadii de vegetație și adaptate la condiții de laborator : *Phragmites communis*, *Typha angustifolia*, *Mentha aquatica*, *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba*, *Lemna minor* și *Lemna trisulca*. Apele uzate experimentale fac parte din aceeași categorie menționată anterior.

Pentru scară pilot s-au utilizat instalații concepute de colectiv și transpuse la scara necesară a debitelor experimentale specifice poluanților din ape uzate.

În determinările de eficiență a procesului de epurare și bioconversie au fost folosite metode de punere în evidență a încărcării organice, a poluanților specifici și a activității enzimatice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetările pentru obținerea de energie s-au făcut mai întîi la scară de laborator, urmînd ca după definitivarea parametrilor să se treacă la scară industrială. În afara testării speciilor de plante, cercetările noi au luat în considerare și compoziția mediului, încărcarea organică maximă admisibilă pentru conversia în masă vegetală, fenomenele hidraulice care sînt prezente sau iau naștere în asemenea instalații, iluminarea, temperatura, automatizarea etc. Pentru faza de laborator și pilot s-au utilizat microfite obținute din epurarea apelor uzate, rezultate din complexe zootehnice (*Chlorella*, *Cladophora*, *Scenedesmus*, *Spyrogira*, *Oedeogonium*), media biomasei fiind de 12 g/m^2/zi substanță uscată, maximum în condițiile de laborator fiind 20 g/l în flux continuu (substanță uscată) (7).

Cu aceleași specii indicate anterior s-au efectuat testări pe ape uzate cianurice rezultate din industria constructoare de mașini, pe ape uzate rezultate din industria pesticidelor organo-fosforice (7—8 g/l substanță organică), pe șlamul format din precipitatul albastru de Prusia (6), precum și tratamente termochimice (3—6 g/l substanță uscată) în flux continuu.

Biomasa obținută a fost introdusă în fermentatoare de laborator de capacitate mică (5—10 l), care au generat gaz la 10—20 de zile de la amorsare. Analizele preliminare indică prezența gazului metan în proporție de 70%. Se constată că prin adăugarea de masă vegetală (obținută ca subprodus din ape uzate) la fermentatoare cu nămol orășenesc se realizează o creștere a eficienței de fermentare, deci o creștere a cantității de biogaz format.

Folosirea macrofitelor în epurarea apelor uzate este mult mai eficientă datorită masei vegetale bogate și care permite o mărire a suprafeței de acțiune. Dintre speciile utilizate în faza de laborator și în faza pilot, menționăm următoarele (2), (8): *Phragmites communis*, *Typha angustifolia*, *Scirpus lacustris*, *Mentha aquatica*, *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Lemna trisulca*, *Wolphya arriza*, *Holeocharis palustris*, *Carex* sp.

Biomasa obținută în cadrul experimentărilor de laborator a fost de 200 g/m^2 substanță umedă/zi pentru grupul de plante *Azolla*, *Lemna*, *Ceratophyllum* și *Cladophora*.

Apele încărcate organic sînt o sursă deosebită de biomasă și, prin urmare, și de biogaz rezultat în urma fermentării.

Concluziile preliminare obținute pe instalații climatizate indică valori semnificative, posibile de realizat tot timpul anului. În calculul pe care îl verificăm, căutăm să obținem stabilirea unei relații între încărcarea organică, exprimată în consum chimic de oxigen (CCO-Cr) al apei, și potențialul ei în biomasă.

Media pe care se lucrează în prezent reprezintă coeficientul de conversie 1,20 înmulțit cu valoarea CCO-Cr a apei uzate. Aceasta poate sugera valoarea cantitativă a biomasei pe care se poate conta într-o apă uzată (9).

Tot ca o concluzie preliminară, putem afirma că o sursă importantă de energie obținută prin conversie o constituie folosirea apelor geotermale în creșterea unor specii de plante adecvate.

Trebuie să remarcăm totodată că speciile *Phragmites* și *Typha* se pretează mai mult la obținerea de energie calorică prin incinerare, fermentarea fiind mult mai scăzută datorită cantității mari de siliciu.

Testarea macrofitelor pe ape uzate orășenești pentru epurare și obținere de biomasă, ca și pe ape agrozootehnice și petrochimice, a dus la rate zilnice de creștere de 208 g/m^2/zi substanță uscată.

Cantitatea de gaz depinde în mare măsură de temperatura realizată și de menținerea ei. Spre deosebire de creșterea unor specii de plante pe medii de cultură, considerăm că folosirea biomasei rezultate ca subprodus este mult mai rentabilă și poate deveni înlocuitor de energie convențională în viitorul apropiat.

Înclinăm spre ideea obținerii de biomasă pe instalații climatizate, unde procesul de producere a biomasei pentru gaz, în afara faptului că ocupă un spațiu redus, poate fi automatizat și dirijat spre diverse categorii de energie din plante obținute ca subprodus.

Prezentat la redacție
la 3 martie 1980

Institutul de științe biologice,
77748, București 17, Splaiul Independenței nr. 296

ENERGY OBTAINED FROM AQUATIC PLANTS, A BY-PRODUCT IN THE PURIFICATION OF WASTE WATERS

SUMMARY

A survey is made on the studies made in our country to evaluate the aquatic plants, a by-product in the purification of waste waters, as a non-conventional source of energy. Some data are presented referring to the biomass obtained by cultivating micro- and macrophytes on various types of waste waters (industrial, sludge, waters from zootechnical complexes, etc.). Preliminary results regarding the formation of methane from by-products are mentioned as well.

BIBLIOGRAFIE

1. V. CHIRIAC, V. GHEDERIM, V. IONESCU-SISEŞTI, C.A.L. NEGULESCU, *Epurarea apelor uzate şi valorificarea reziduurilor din industria alimentară şi zootehnie*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1975, p. 165.
2. M. GODEANU, C. IULIAN, V. ISVORANU, Romanian patent 69524/1978.
3. M. STANCU, B. SEGAL, *Surse noi de proteine*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1975, p. 64.
4. R. de la TAILLE, Science et vie, **678**, 27 (1979).
5. B.C. WOLVERTON, C.R. McDONALD, Ambio, **8**, 2 (1979).
6. M. GODEANU, S. SAVA, E. COSMIN, V. ISVORANU, S. GODEANU, Romanian patent 69528/1978.
7. M. GODEANU, C. IULIAN, D. BOTI, S. GODEANU, I. LUP, D.M. PREDESCU, Romanian Patent 69527/1978.
8. M. NICOLESCU, V. ISVORANU, Rev. roum. Biol., **32**, 68 (1980).
9. M. GODEANU, S. SAVA, Rev. roum. Biol., **32**, 37 (1980).

UTILIZAREA PLANTELOR ACVATICE CA SURSĂ DE ENERGIE *

MARIOARA GODEANU, O. BOLDOR, H. D. SCHELL

Rezumat. Se prezintă în mod succint cercetările româneşti legate de posibilitatea utilizării plantelor acvatice ca sursă neconvenţională de energie. Un accent deosebit s-a pus pe alegerea mediilor optime nutritive, precum şi a plantelor acvatice cele mai productive. A fost cercetată totodată şi influenţa temperaturilor şi a lungimilor de undă optime ale luminii folosite la iradiere, precum şi influenţa diferitelor tipuri de instalaţii în dezvoltarea plantelor acvatice.

Dezvoltarea economică şi socială impetuoasă care a avut loc pe plan mondial, mai ales în ultimele decenii, pune în faţa omenirii probleme serioase care privesc resursele energetice naturale prezente şi prognozate. Statisticile elaborate indică necesitatea orientării cercetărilor spre noi surse de energie neconvenţională.

Criza de energie a atras atenţia asupra faptului că procesul de fotosinteză, cu toate că prezintă un randament scăzut, transformă totuşi anual energia solară şi o stochează în formă chimică stabilă în cantităţi care depăşesc necesităţile noastre energetice. Se apreciază astfel că în S.U.A. sursa cea mai mare de energie solară folosită în prezent ca sursă potenţială de combustibil solid sau lichid înmagazinat este biomasa vegetală (1).

Redescoperirea biomasei vegetale se face în raport cu modalităţile de conversie, dovadă numeroasele programe naţionale create în diverse ţări pentru folosirea integrală a masei vegetale. Acestea au generat o multitudine de cercetări menite să aducă o contribuţie importantă în obţinerea de energie, ca, de exemplu, în Brazilia, Japonia, S.U.A. (Nebraska), Austria, România, Cehoslovacia, Suedia.

Ca primă problemă în cercetarea surselor de energie neconvenţională a fost găsirea speciilor de plante acvatice producătoare ale unei cantităţi importante de biomasă. Astfel, cercetările din cadrul National Space Technology Laboratory (NSTL) au demonstrat puterea remarcabilă de producere a biomasei umede (zi/ha) pe care o are zambila de apă (2).

Cercetări importante au fost efectuate asupra unor specii de alge cu factori de conversie prin fotosinteză foarte avantajoşi (3—5%) din lumina solară primită. Randamentul biomasei oscilează, în funcţie de diversele condiţii, între 100 şi 300 kg/zi/ha, ceea ce ar corespunde, raportat la un randament mediu de biomasă (de ex. la 160 kg/ha/zi), la 74 000 kWh/an.

---

* Comunicare prezentată la Institutul de radiochimie din Innsbruck, Austria, în cadrul întîlnirii de lucru bilaterale dintre România şi Austria în problema „Energie din biomasă", 26 februarie — 2 martie 1979.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru evidenţierea posibilităţilor de obţinere a energiei neconvenţionale din plante acvatice s-au utilizat la scară de laborator şi pilot specii de microfite acvatice obţinute în sistemul de cultivare introduse de colectiv. Dintre microfite citäm : *Chlorella vulgaris, Scenedesmus, Chlamidomonas* şi *Cladophora.*

Sistemele de iluminare şi temperatură s-au menţinut constante în instalaţii în funcţie de speciile microfitelor utilizate.

Speciile de macrofite, dintre care menţionăm *Mentha aquatica, Chara fragilis, Potamogeton pectinatus, Stratiotes aloides, Lemna minor* etc., au fost recoltate din bazinul dunărean şi adaptate în laborator.

S-au utilizat, atit pentru microfite cit şi pentru macrofite, instalaţii climatizate cu posibilitate de vehiculare continuă a apei de alimentare.

Analizele efectuate s-au axat pe determinări de proteină şi ale activităţii enzimatice, folosind metode standardizate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cercetările din România au fost axate în special pe obţinerea de biomasă pentru nutriţia animalelor, respectiv obţinerea de proteină, reuşindu-se o producţie de 400 t/ha/an la algele *Chlamidomonas reinhardti, Scenedesmus* sp. şi *Chlorella* sp. crescute în bazine deschise (3).

Preocupări de bază în cercetările româneşti s-au referit mai ales la condiţiile de nutriţie, iluminare, precum şi la posibilităţile de cultivare continuă la unele specii de *Scenedesmus, Chlorella, Spyrogira* şi *Cladophora.* Condiţiile de creştere, după cum ştim, influenţează compoziţia chimică a algelor, foarte importantă de altfel, în procesele de fermentare. Aşa, de exemplu, prezenţa azotatului în mediu favorizează biosinteza glucidelor, iar ureea pe cea a protidelor. O creştere autotrofă favorizează formarea de proteine, în timp ce o creştere heterotrofă determină mărirea cantităţii de hidraţi de carbon (4).

Avînd în vedere rolul luminii în dezvoltarea algelor şi a biosintezei, s-au pus la punct sisteme automate de cultivare în condiţii de iluminare intensivă, evitîndu-se totodată efectele negative ale luminii în perioada de creştere. Cercetările au abordat de asemenea şi influenţa diferitelor zone ale spectrului de lumină. S-a constatat astfel că acidul aspartic, glicina şi serina îşi diminuează cu 20—30% cantitatea în culturile de *Chlorella* atunci cînd sînt iluminate cu lumina roşie, care conţine 4% radiaţii albastre, spre deosebire de situaţia iluminării numai cu lumina roşie. Aplicarea luminii monocromate albastre, roşii şi galbene la începutul perioadei de lumină completă şi în ordine inversă la sfîrşitul perioadei are ca rezultat o proteosinteză mai accentuată.

În legătură cu posibilităţile de cultivare intensivă a algelor în România pentru obţinerea de biomasă s-au realizat mai multe tipuri de instalaţii experimentale în flux continuu. Mediile nutritive folosite sînt cele economice, tinzîndu-se prin cercetări la simplificarea lor ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, KH_2PO_4, uree, EDTA). Temperatura de lucru a fost de 25—30°C. Recuperarea biomasei în scopul folosirii în fermentare se face în prezent cu separatoare centrifugale avînd 4500—5000 turaţii/min, filtrări, raclări etc. (3).

A doua categorie de cercetări începute în România s-au axat pe testarea speciilor acvatice din flora spontană care constituie o importantă

sursă de energie. Dintre speciile cercetate în acest sens, mai ales pentru productivitate, menționăm: *Chara fragilis*, *Ceratophyllum demersum*, *Potamogeton pectinatus*, *Myriophyllum spicatum*, *Nitelopsis obtusa*, *Stratiotes aloides*, *Lemna minor*, *Lemna gibba*. Aceste plante, în afară de *Nitelopsis*, *Stratiotes* și *Chara*(testate numai în bazine deschise), constituie specii crescute pe instalații climatizate. Rata zilnică de creștere maximă a biomasei umede a fost, în condiții de laborator, de 100 g/m²/zi. Mediile nutritive sînt cele pe bază de azot, fosfor, carbon și microelementele clasice. Temperatura de lucru necesară a fost în medie de 25°C. Cercetările preliminare au dus la concluzia că speciile pretabile la fermentare sînt *Myriophyllum*, *Lemna*, *Ceratophyllum*, care pot produce gaz metan în proporție de 67% (4).

Cantitatea de gaz crește atunci cînd se face amestecul dintre masa vegetală și nămolul rezultat din încărcarea organică menajeră.

Continuarea cercetărilor în direcția cunoașterii mecanismelor unor procese biologice fundamentale poate conduce la dirijarea experimentală și apoi industrială, cu o eficiență maximă în obținerea de gaz din plante acvatice.

Trebuie totuși să amintim că cel puțin pentru etapa actuală energia produsă prin bioconversie a speciilor din flora spontană nu este competitivă cu sursele tradiționale de energie, dar deschide calea perspectivei anilor următori.

Prezentat la redacție
la 3 martie 1980

Institutul de științe biologice,
77748, București 17, Splaiul Independenței nr. 296

AQUATIC PLANTS AS A SOURCE OF ENERGY

SUMMARY

The Romanian investigations regarding the possibility to use aquatic plants as a nonconventional source of energy are briefly presented. Special attention was paid on the selection of the best nutritive media as well as of the most productive aquatic plants. The influence on the growth of aquatic plants of various temperatures of the best light wavelengths used in the irradiation as well as of various types of installations was investigated.

BIBLIOGRAFIE

1. R. de la TAILLE, Science et vie, **678**, 27 (1979).
2. B.C. WOLVERTON, C.R. McDONALD, Ambio, **8**, 2 (1979).
3. M. STANCIU, B. SEGAL, *Surse noi de proteine*, Edit. tehnică, București, 1975, p. 64.
4. M. GODEANU, V. ISVORANU, I. HURGHIȘIU, Rev. roum. Biol., **32**, 123 (1980).

TRATAMENTUL RĂNILOR LA ANIMALE CU ULEI EXTRAS DIN FRUCTE COAPTE DE *HYPPOPHAË RHAMNOIDES* L.

GAVRIL NEAMŢU *, ALEXANDRU COCIU * *

Rezumat. S-a cercetat efectul uleiului obţinut din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* în procesul de vindecare a rănilor la animale domestice, în comparaţie cu manisul (cicatrizinul), eterul iodoformat 10% şi spray-ul clorhexidin-diacetat 1%, medicamente folosite în mod curent în tratamentul rănilor la animale. Uleiul obţinut din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*, prin compoziţia sa chimică complexă, reduce timpul de vindecare al rănilor la animale cu 14—23 de zile faţă de substanţele utilizate în prezent în vindecarea acestor afecţiuni.El nu are acţiuni secundare nocive asupra organismelor şi se poate obţine cu uşurinţă din fructele coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, arbust ce creşte spontan pe suprafeţe întinse în ţara noastră.

Rănile, prin frecvenţa, variabilitatea şi gravitatea lor, au constituit din cele mai vechi timpuri obiectul a numeroase şi variate cercetări în domeniul medicinii veterinare. Cu toate că pînă în prezent s-au utilizat pe plan mondial numeroase substanţe în tratamentul rănilor, încă nu s-a găsit medicamentul ideal pentru vindecarea acestor afecţiuni (1) —(7).

Substanţele medicamentoase utilizate pînă în prezent în ţara noastră în tratarea rănilor au dezavantajul că determină cicatrizarea acestora într-un timp relativ îndelungat, sînt scumpe,unele se procură din import şi nu duc la o regenerare rapidă a ţesuturilor lezionate. Un kilogram de iodoform, substanţă procurată din import şi folosită de noi în mod frecvent în tratamentul rănilor, costă 1 000 de lei, un kilogram de manis costă 110 lei, iar un kilogram de spray costă 125 de lei.

Hyppophaë rhamnoides (cătină) se prezintă sub formă de arbust, înalt de 1,5—3,5 m, la care florile apar înaintea frunzelor. Fructele sînt drupe false, de 7—8 mm lungime, care la coacere au o culoare galben-portocalie şi conţin un lichid lipicios şi iritant. Prin substanţele ce conţin, fructele de cătină se comportă ca o *polivitamină naturală*. În fructele coapte se găsesc în cantitate mare pigmenţi carotenoidici (care le determină culoarea galben-portocalie), vitamine, glicozide, acizi graşi superiori, aminoacizi, fitosteroli, alcaloizi, uleiuri volatile, fitohormoni etc. (8)—(12).

Datorită faptului că fructele de *Hyppophaë rhamnoides* conţin numeroase substanţe cu rol biologic însemnat, pe baza cercetărilor proprii întreprinse, am utilizat pînă în prezent aceste fructe la obţinerea unor preparate alimentare tonice şi dietetice, precum şi ca surse de carotenoide în hrana păsărilor şi a peştilor (13)—(16).

În ultimii ani s-a atribuit o atenţie sporită uleiului extras din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*, care se utilizează cu succes în tratarea unor

afecțiuni ale aparatului digestiv, în epitelizarea leziunilor oculare, în tratamentul arsurilor și degerăturilor, al plăgilor, în tratarea ulcerului varicos, precum și în tratamentul unor afecțiuni genitale (14), (17), (18).

În această lucrare se prezintă rezultatele cercetărilor experimentale privind efectul uleiului din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* în vindecarea rănilor la 163 de animale, în comparație cu manisul, eterul iodoformat 10% și spray-ul clorhexidindiacetat 1%.

MATERIAL ȘI METODE

Uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* s-a extras cu acetonă în aparatul Soxhlet. Extractul primar de ulei se concentrează ulterior pînă la îndepărtarea totală a acetonei. Pentru a ușura extragerea uleiului din fructe coapte, acestea se usucă în prealabil la umbră sau în etuve la temperaturi de pînă la 40°C ; se macină într-o moară cu valțuri și apoi sub formă de făină se utilizează la extragerea uleiului. Conținutul uleiului din fructe este cuprins între 20 și 22% substanță uscată. Costul unui kilogram de ulei obținut prin procedeul descris anterior este de 56 de lei.

În uleiul extras din fructele de cătină predomină gliceridele acizilor palmitic, miristic, palmitoleic, stearic, oleic și linoleic, alături de care se găsesc steroli, a minoacizi liberi (citrulină, alanină, acid γ-aminobutiric, metionină, triptofan), cantități apreciabile de carotenoide și de acid 3-indolil-acetic (17), (19).

Prin analiza gaz-cromatografică, A. Roșu (17) a stabilit următoarea compoziție procentuală a acizilor grași superiori existenți în ulei : acid miristic 0,25%, acid palmitic 74,25%, acid palmitoleic 11,88%, acid stearric 5,75%, acid oleic 0,79%, acid linoleic 7,18%.

Cercetările s-au efectuat în clinica de chirurgie a Facultății de zootehnie și medicină veterinară de la Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj-Napoca în perioada 1976—1978 și s-au repetat pe alte cazuri clinice în 1980—1981.

Efectul uleiului din fructe coapte de *Hyppophal rhamnoides* s-a cercetat în procesul de vindecare al rănilor pe opt cazuri experimentale, opt oi de aceeași vîrstă, stare de întreținere și greutate corporală, pe un număr de 75 cazuri clinice, dintre care 23 cabaline, 23 bovine, 6 ovine și 23 carnasiere în perioada 1976—1978, și pe 80 de cazuri clinice în 1980—1981, dintre care 20 cabaline, 30 bovine, 10 ovine și 20 carnasiere.

La cele opt oi care au constituit cazurile experimentale s-au făcut în regiunea dorsolombară a fiecărui animal cîte patru răni : două în partea dreaptă și două în partea stîngă. Toate rănile s-au făcut de aceleași dimensiuni, 7 × 7 cm. Fiecare rană s-a tratat zilnic cu una din următoarele substanțe : ulei din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, manis, eter iodoformat 10% și spray. Prin acest procedeu experimental s-a putut observa comparativ efectul celor patru substanțe utilizate pe același organism. Uleiul din fructe de cătină s-a aplicat atît la cazurile experimentale, cît și la cele clinice pe suprafețe și, respectiv, marginile rănii, sub formă de ușoare badijonări, cu ajutorul unor comprese de tifon. Pentru efectuarea unui tratament s-au folosit la cazurile experimentale cîte 4—5 ml ulei, iar la cazurile clinice cantitatea de ulei a variat în funcție de mărimea rănii.

Rezultatele experienței au fost urmărite atît din punct de vedere clinic, prin inspecție zilnică, cît și prin măsurători efectuate din trei în trei zile. S-au urmărit de asemenea modificările histologice și histoenzimologice apărute la nivelul celor patru răni la patru săptămîni de la producerea lor. Dintre enzime s-a determinat activitatea fosfatazei alcaline, a lipazei și a sulfatazelor. S-au făcut de asemenea observații referitoare la acțiunea bactericidă a uleiului din fructe coapte de cătină.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dintre compușii chimici existenți în uleiul extras din fructele coapte de cătină, un rol însemnat în procesul de vindecare al rănilor revine cu siguranță pigmenților carotenoidici și acizilor grași nesaturați, care prin sistemul de duble legături (conjugate și izolate) existente în moleculă au

un rol însemnat în procesele de oxidoreducere, iar prin polimerizare pot grăbi formarea crustei la suprafața rănilor. Alături de acești compuși, fără îndoială că enzimele, vitaminele și fitohormonii contribuie din plin la refacerea țesuturilor lezate.

Conținutul mediu al pigmenților carotenoidici din uleiul extras din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul mediu al pigmenților carotenoidici din uleiul extras din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*

Carotenoide	Conținutul carotenoidelor (μg/g ulei)	Repartizarea procentuală
Carotenoide provitaminice		
α-carotina	3,8	0,7
β-carotina	298,3	55,3
γ-carotina	49,0	9,1
Criptoxantină	80,0	14,8
Total carotenoide provitaminice	431,1	79,9
Carotenoide neprovitaminice		
Licopină	28,0	5,2
Luteină	20,0	3,7
Zeaxantină	41,0	7,6
Violaxantină	19,0	3,5
Total carotenoide neprovitaminice	108,0	20,0
Total carotenoide	539,1	99,0

După cum reiese din determinările efectuate, uleiul de cătină are un conținut ridicat de carotenoide, în mod deosebit carotenoide provitaminice, care reprezintă aproape 80% din totalul carotenoidelor existente, fapt deosebit de important, deoarece carotenoidele provitaminice, sub influența carotenazei, se transformă la nivelul rănilor în vitamină A, care are un rol de bază în refacerea țesuturilor lezate și în creșterea organismelor.

Din punct de vedere clinic, după o săptămînă de tratament nu s-au constatat deosebiri semnificative în ceea ce privește cicatrizarea rănilor tratate cu cele patru substanțe medicamentoase. Începînd însă cu săptămîna a doua, s-a observat că cicatrizarea se produce mai repede la rănile tratate cu ulei, comparativ cu rănile tratate cu celelalte trei substanțe. În urma efectuării măsurătorilor s-a constatat că rănile tratate cu ulei de *Hyppophaë rhamnoides* s-au vindecat cel mai repede, la 60 de zile de la

producerea lor, cele tratate cu manis la 74 de zile, cele tratate cu iodoformat 10 % la 78 de zile, iar cele tratate cu spray s-au vindecat la 83 de zile.

Din analiza secţiunilor histologice efectuate la o lună de zile de la producerea rănilor a reieşit de asemenea că cicatrizarea cea mai avansată o prezintă rănile tratate cu ulei, după care urmează, în ordine, rănile tratate cu manis, apoi cele tratate cu eter iodoformat 10 % şi spray.

Din punct de vedere enzimologic se constată că activitatea fosfatazei alcaline, a lipazei şi a sulfatazelor este mult mai intensă în rănile tratate cu ulei de cătină decît în rănile tratate cu celelalte substanţe.

În urma cercetărilor de microbiologie se constată că uleiul de cătină are un efect inhibitor asupra unor specii bacteriene, precum colibacilii, proteusul, salmonelele şi antraxul.

Din rezultatele examenelor clinice, din cercetările histologice, histoenzimologice şi bacteriologice reiese că uleiul din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* stimulează într-o măsură mai mare procesul de vindecare al rănilor decît manisul, eterul iodoformat 10% şi spray-ul.

Prin utilizarea uleiului din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* în tratarea şi în vindecarea rănilor la animale s-ar realiza valorificarea superioară a acestei plante, atît de larg răspîndită în ţara noastră, s-ar putea renunţa la importurile de cicatrizanţi, cei indigeni fiind calitativ superiori faţă de cei existenţi în prezent în reţeaua farmaceutică internaţională, ceea ce ar crea posibilităţi de export şi implicit noi surse valutare.

CONCLUZII

1. Uleiul din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* are o compoziţie chimică complexă, cu un conţinut ridicat de carotenoide provitaminice, gliceride, acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi, steroli, fitohormoni, glicozide, uleiuri eterice etc., substanţe care au un efect pozitiv asupra vindecării rănilor la animale.

2. Efectul uleiului din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* în procesul de vindecare a rănilor s-a cercetat pe opt cazuri experimentale şi pe 155 de cazuri clinice, dintre care 43 cabaline, 53 bovine, 16 ovine şi 43 de carnasiere.

3. Din rezultatele examenelor clinice, din cercetările histologice, histoenzimologice şi bacteriologice reiese că uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* reduce cu 14—23 de zile timpul de vindecare al rănilor, în comparaţie cu manisul, eterul iodoformat 10% şi spray-ul.

4. Avînd în vedere că uleiul din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* determină vindecarea rănilor într-un timp mai scurt decît celelalte substanţe utilizate, că are un preţ de cost mai scăzut şi că se poate obţine cu uşurinţă, considerăm necesară şi oportună utilizarea acestui produs în practica medicinii veterinare, la scară naţională şi internaţională.

Prezentat la redacţie
la 7 octombrie 1981

* *Disciplina de chimie şi biochimie vegetală,*
Facultatea de agricultură,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca
şi
** *Disciplina de chirurgie,*
Facultatea de zootehnie şi medicină veterinară,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca

ANIMAL WOUND HEALING WITH OIL EXTRACTED FROM RIPE FRUITS OF *HYPPOPHAË RHAMNOIDES* L.

SUMMARY

The effects of *Hyppophaë rhamnoides* oil on the healing of wounds in domestic animals have been studied comparatively with other substances currently used with these ailments — manis (or Cicatrizin), iodoformized ether 10% and chlorhexidine diacetate 1%.

The oil obtained from fruits of *Hyppophaë rhamnoides*, owing to its complex chemical composition, shortens the healing period in animals by 14—23 days as compared with the substances in use.

It does not possess noxious side effects and can readily be obtained from the ripe fruits of *Hyppophaë rhamnoides*, a bushy plant widely spread throughout the country.

BIBLIOGRAFIE

1. A.B. KOVACS, K. SOMAGYVARI, M. GERENDÁS, Z. GRÁF, Magyar Allatorvosok Lapja, **9**, 476 (1969).
2. A.B. KOVACS, K. SOMAGYVARI, E. FELKAI, Z. GRÁF, Magyar Allatorvosok Lapja, **11**, 611 (1969).
3. L. Y. LOKTIONOVA, T.G. TROISKAYA, Sbornik Nauchnykh Trudov, Moskovskaia Veterinaria Akademia, **69**, 115 (1973).
4. N. MOROȘANU, LUCIA COCOȘ, GH. RADU-TUDORACHE, I. BUHTAN, Lucrări științifice, seria Zootehnie și Medicină Veterinară, Inst. agronomic Iași, 1972.
5. D. TEODORESCU, AL. STUPARIU, Lucrări științifice, seria Medicină Veterinară, Inst. agronomic Timișoara, **XIII**, 315 (1970).
6. O. VLĂDUȚIU, Probleme zootehnice și veterinare, **2**, 51 (1954).
7. O. VLĂDUȚIU, I. MURGU, Revista de zootehnie și medicină veterinară, **7**, 45 (1965).
8. E. GRIGORESCU, *Contribuții la studiul farmacognostic și fitochimic al speciei Hyppophaë rhamnoides*, teză de doctorat, IMF — București, 1963.
9. I. BRAD, F. SILVA, C. OLTEA, E. IOLK, M. ZOIȚA, G. MARTINOVISKI, E. VOICU, Analele Institutului de cercetări pentru cereale și plante tehnice, Fundulea-București, **XLI**, 651 (1976).
10. G. NEAMȚU, CORINA BILĂUȘ, T. LASZLO, K.L. SIMPSON, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
11. E. GRIGORESCU, Farmacia, **12**, 655 (1964).
12. E. GRIGORESCU, ELENA TARPO, Farmacia, **12**, 357 (1964).
13. G. NEAMȚU, CORINA BILĂUȘ, T. LASZLO, *Obținerea unor preparate tonice și dietetice din fructe de Hyppophaë rhamnoides*, Contract de cercetare între Inst. agronomic Cluj-Napoca și CNȘT-București, 1976.
14. G. NEAMȚU, GH. SĂLĂJAN, T. LASZLO, CORINA BILĂUȘ, K. L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **20**, 63 (1977).
15. G. NEAMȚU, GH. SĂLĂJAN, CORINA BILĂUȘ, T. LASZLO, C. BODEA, K. L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **14**, 109 (1977).
16. T. KAMATA, G. NEAMȚU, K. L. SIMPSON, Rev. roum. Biochim., **14**, 253 (1977).
17. AURA ROȘU, Buletin științific studențesc, București, 1977, p. 87.
18. L. TIMBUȘ, *Cătina albă*, Flacăra, nr. 1340 din 12. II. 1981.
19. E. GRIGORESCU, *Produse farmaceutice*, Edit. medicală, București, 1971.

MODIFICĂRI ALE LACTATDEHIDROGENAZEI DIN FICAT ÎN URMA IRADIERII CU RADIAŢII GAMMA *IN VIVO*

RADU OLINESCU, DESPINA TEODOSIU

Rezumat. Lactatdehidrogenaza (LDH) din ficatul de şobolani normali şi iradiaţi cu diferite doze a fost parţial purificată. Studiul reacţiei catalizate de LDH a arătat că în urma iradierii scad atît activitatea enzimei, cît şi afinitatea ei pentru diferite substraturi. Variaţia grupărilor SH reactive confirmă modificările observate legate de doza de iradiere. Modificările structurale discrete, astfel produse, determină variaţiile cinetice.

Lactatdehidrogenaza (E.C.1.1.1.27) ocupă o poziţie cheie în glicoliză şi implicit în menţinerea echilibrelor acidobazic şi energetic. Determinarea activităţii LDH în interes clinic este necesară în infarctul miocardic, în necroza toxică hepatică şi în unele boli hematologice.

În boala de iradiere, determinarea activităţii LDH a dus la rezultate controversate (1), (2) privind atît enzima din ser, cît şi cea din ficat. De asemenea, determinarea izoenzimelor LDH nu a dus la rezultate concludente (2). Rolul acestei enzime în boala de iradiere este cu atît mai interesant cu cît după iradiere s-a constatat creşterea formării acizilor lactic şi piruvic în multe ţesuturi (3), (4). Datorită rolului important al LDH în menţinerea homeostaziei organismului, se impune un studiu al proprietăţilor cinetice şi structurale, care ar permite o analiză mai fină a modificărilor activităţii enzimei în boala de iradiere sau după iradieri terapeutice.

MATERIAL ŞI METODE

Au fost utilizaţi şobolani Wistar în greutate de 180±20 g, hrăniţi standardizat. Iradierea şobolanilor s-a efectuat cu radiaţii gamma, Co^{60}, energie 1,13 MeV, debit 37 R/minut, cu doze de 500, 1 000 şi 1 500 Rads. După 24 de ore de la iradiere, şobolanii normali şi iradiaţi au fost sacrificaţi sub narcoză cu eter; ficatul a fost recoltat şi păstrat la −20°C pînă la utilizare. Omogenatul a fost obţinut în tampon fosfat 10 mM, pH 7,7, utilizînd un omogenizator tip Waring blendor şi centrifugînd 15 minute la 1 200 g. Purificarea s-a efectuat în condiţii identice atît pentru probele luate de la animalele normale, cît şi de la cele iradiate cu dozele amintite, fiecare lot fiind format din cîte trei animale.

Activitatea enzimei s-a studiat în ambele sensuri ale reacţiei catalizate de LDH prin urmărirea variaţiei absorbţiei NADH de la 340 nm, după metoda utilizată de Kornberg (5). Studiul modificărilor grupărilor sulfhidril (SH) s-a efectuat după tehnica indicată de Birschmeyer şi Wilson (6) în condiţiile şi modificările descrise anterior (7).

St. cerc. biochim., 25, *1*, 35–40 (1982)

REZULTATE

Purificarea parţială a enzimei. După numeroase tatonări, LDH din ficatul animalelor normale şi iradiate a fost parţial purificată, folosindu-se fracţionări cu sulfat de amoniu şi metanol la rece, cu randamentele prezentate în tabela 1. Continuarea purificării prin asociere cu cromatografie

Tabela 1

Etapele şi randamentul purificării lactatdehidrogenazei din ficat

Etapa de purificare	Volum (ml)	Proteină (mg/ml)	Activitate specifică *	Factor de purificare
Omogenat	95	4,3	1,48	1,0
$(NH_4)_2SO_4$ 60—90 %	25	2,8	3,92	2,64
Metanol 0—40 %	6	3,1	6,19	4,18

* μmoli NADH/mg proteină.

pe coloană nu a permis, mai ales pentru probele obţinute de la animale iradiate, creşterea randamentelor, aşa încît studiile cinetice s-au efectuat pe produsele obţinute după fracţionarea cu metanol.

Studii cinetice. După cum s-a arătat în introducere, măsurarea activităţii LDH totale din ser sau omogenat de ficat nu a dus la rezultate concludente. În figura 1 sînt prezentate variaţiile duratei reacţiei catalizate de LDH. Se observă chiar după purificarea întreprinsă că numai după o doză mare, de 1 500 Rads, apare o schimbare semnificativă a formei

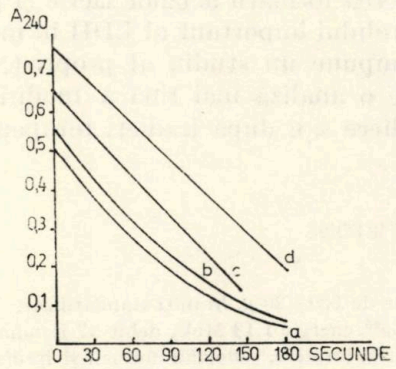


Fig. 1. — Cinetica reacţiei catalizate de lactatdehidrogenază din ficat parţial purificată şi extrasă de la animale normale (*a*), iradiate cu 500 (*b*), 1 000 (*c*) şi 1 500 (*d*) Rads. Mediul de reacţie a fost compus din piruvat $3,6 \cdot 10^{-4}$ Moli, NADH $3,3 \cdot 10^{-5}$ Moli, tampon fosfat $5 \cdot 10^{-3}$ Moli şi enzimă ajustată la o concentraţie în proteină de 1,5 mg/ml. Volumul final al reacţiei 3 ml.

curbei ce descrie terminarea reacţiei catalizate de LDH, devenind evidentă tendinţa de prelungire a duratei reacţiei.

În continuare am studiat modificările produse de iradiere asupra afinităţii enzimei faţă de diferitele substraturi participante în reacţia catalizată de LDH. Astfel, în figurile 2 şi 3 sînt prezentate variaţiile constantei K_M (ca măsură a afinităţii enzimei), în funcţie de doza de iradiere *in vivo*. Din figurile 2 şi 3 este dificil de a obţine concluzii clare, deoarece formele curbelor variază destul de mult cu doza de iradiere. Doar la doza mare, de 1 500 Rads, se constată o creştere semnificativă a constantei K_M pentru

NADH, lactat și α-cetoglutarat, în timp ce pentru piruvat se constată, din contră, o revenire la valorile normale. La doza mică, de 500 Rads, se remarcă modificarea mai semnificativă a curbei pentru piruvat și într-o mai mică măsură pentru lactat și α-cetoglutarat. Mai trebuie remar-

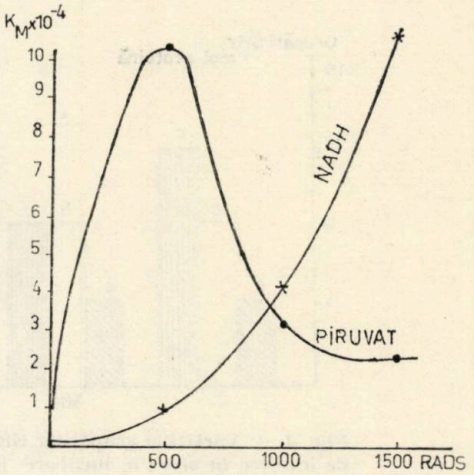


Fig. 2. — Variația constantei Michaelis, K_M, a LDH parțial purificate în funcție de doza de iradiere *in vivo*. Mediul de reacție a fost același ca pentru figura 1, cu excepția variațiilor concentrațiilor de piruvat sau de NADH. Valorile constantei K_M pentru substraturile respective au fost obținute grafic prin procedeele clasice (metoda Lineweaver-Burk).

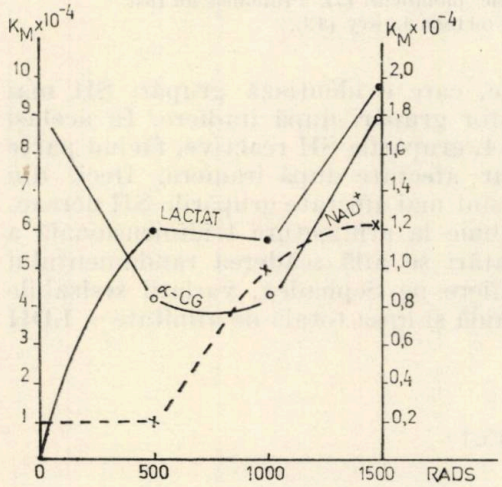


Fig. 3. — Variațiile constantelor Michaeli, K_M, ale LDH parțial purificate în funcție de doza de iradiere *in vivo*. Folosind aceeași metodă de determinare a activității LDH (5), s-a studiat reacția catalizată în sens invers, înlocuind substraturile cu lactat și NAD, sau în sens direct, cu α-cetoglutarat. Valorile constantei K_M au fost obținute prin aceeași metodă ca în figura 2; NAD^+ (dreapta), lactat și α—CG (stînga).

cat că, în cazul coenzimelor NADH și NAD, forma curbelor este destul de asemănătoare, mai ales în prima jumătate a curbelor sigmoidale.

Modificările constantei K_M a LDH pentru diferite substraturi produse de iradiere indică variații semnificative ale afinității enzimei. Scăderea afinității LDH, mai ales pentru dozele mari, indică modificări ale structurii secundare cu expunere diferită a centrilor activi ai enzimei.

Studiul grupărilor sulfhidril. Prin studiul grupărilor SH ale LDH parțial purificate am urmărit corelarea modificărilor afinității enzimei

faţă de diferite substraturi cu gradul de expunere a centrilor activi. În acest sens am determinat numărul de grupări SH reactive, în funcţie de temperatură şi de doza de iradiere. În figura 4 sînt redate variaţiile grupărilor SH reactive în funcţie de doza de iradiere la temperatura camerei (*a*), la 38°C (*b*) şi în prezenţa dodecilsulfatului de sodiu ca agent tensio-

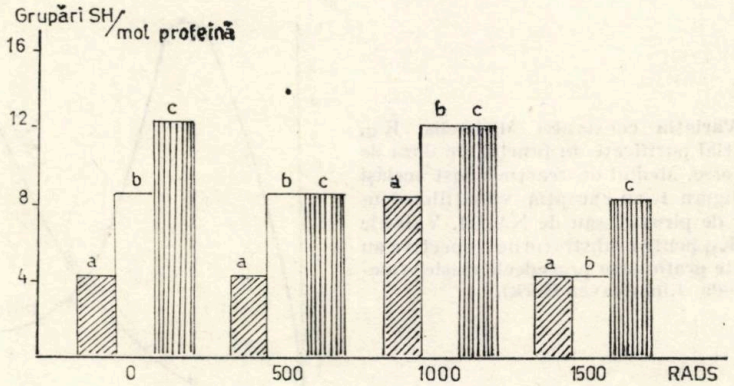


Fig. 4. — Variaţiile grupărilor SH/mol de proteină în funcţie de doza de iradiere *in vivo* : *a*, incubare la + 22°C ; *b*, incubare la + 37°C ; *c* incubare la + 22°C în prezenţa a 1% dodecilsulfat de sodiu în tampon fosfat. Grupările SH s-au determinat după tehnica descrisă de Birschmeier şi Wilson (6) cu unele modificări (7). Proteinele au fost determinate după metoda Lowry (13).

activ (*c*). Ultimele două tratamente, care evidenţiază grupări SH mai puţin expuse, indică afectarea acestor grupări după iradiere. În acelaşi timp, aşa cum se observă din figura 4, grupările SH reactive, făcînd parte din centrul activ al enzimei, nu par afectate după iradiere. Deci, din figura 4 rezultă că în urma iradierii sînt mai afectate grupările SH nereactive, mai puţin expuse, care contribuie la arhitectura tridimensională a enzimei. În sprijinul acestei constatări se află scăderea randamentului purificării enzimei prin cromatografiere pe Sephadex, variaţii sesizabile în electroforeza pe gel de poliacrilamidă şi lipsa totală de afinitate a LDH pentru glioxilat ca substrat.

DISCUŢII

Datele noastre experimentale arată că LDH parţial purificată prezintă modificări cinetice şi structurale ce s-au păstrat şi după iradierea *in vivo*, în ciuda tratamentului folosit la purificare. Atît durata reacţiei (fig. 1), catalizată de LDH, cît şi afinitatea enzimei (demonstrată prin variaţia constantei K_M) faţă de diferite substraturi variază în funcţie de doza de iradiere (fig. 2 şi 3). Din studiile cinetice se întrevede o tendinţă de creştere a constantei K_M pentru mai multe substraturi, mai ales la doze mari de iradiere. Această tendinţă nu este clară, mai ales în cazul piruvatului (fig. 2).

Totuși, modificarea duratei reacției (fig. 1), variațiile mari ale constantei K_M cu doza de iradiere (fig. 2 și 3) și ale numărului de grupări SH (fig. 4) sau observațiile menționate la sfîrșitul părții anterioare sugerează mai pregnant producerea în urma iradierii a unor modificări în structura secundară a enzimei.

Acțiunea radiațiilor gamma asupra LDH purificate sau oxigenului a fost studiată de Winstead și Reece (8) și, respectiv, de Schuessler și Herget (9). În ambele cazuri s-au constatat modificări cinetice asemănătoare cu cele observate de noi, dar realizate la doze de 10^5 ori mai mari. Aceste lucrări au confirmat și datele noastre cu privire la modificările grupărilor SH ale enzimei după iradiere. Cele patru grupări SH fac parte din structura centrului activ al LDH (10) : inhibarea acestora scade doar parțial activitatea enzimei, deoarece, deși fac parte din microstructura centrului, nu sînt implicate direct în activitatea catalitică. În acest sens, iradierea *in vivo* afectează activitatea LDH indirect, prin modificări conformaționale cu caracter aleatoriu la doze moderate. Această constatare se situează alături de cea similară demonstrată de Winstead și Reece (8) și recent de Schuessler și Herget (9), obținută prin iradierea enzimei înalt purificate. De altfel, așa cum s-a arătat într-o lucrare anterioară (11), în urma iradierii se produce o „rigidizare" a lanțurilor polipeptidice ale enzimelor, care nu permit mici modificări conformaționale inerente activității enzimatice. Doar pentru doze mari (peste 1 500 Rads *in vivo* sau peste 50 KRads *in vitro*) se produc scindări catenare, formarea de agregate cu pierderea totală a activității.

Datele noastre arată că, pentru doze de iradiere moderate pînă la letale (500—1 000 Rads), LDH nu suferă modificări importante ale centrilor activi, așa încît enzima poate face față creșterii acizilor lactici și piruvici (3), (4) din țesuturi. Variațiile activității LDH din plasmă și țesuturi (1), (2), (12) pot să reprezinte eliberarea enzimei din celulele distruse în urma impactului direct al radiațiilor sau a radicalilor liberi produși ulterior. Scăderea activității LDH plasmatice, observată în faza finală a bolii de iradiere după o doză letală (12), se poate datora și existenței unor molecule de enzimă alterate, cu activitate catalitică micșorată, așa cum au arătat datele prezentate (fig. 1—3) ; în acest caz, LDH va contribui la scăderea și mai mare a glicolizei, proces afectat chiar de doze moderate (2).

Prezentat la redacție
la 16 octombrie 1981

Spitalul clinic Fundeni,
Clinica de radiobiologie, București 7000

MODIFICATIONS OF LACTATE DEHYDROGENASE FROM THE RAT LIVER FOLLOWING THE *IN VIVO* IRRADIATION WITH GAMMA RAYS

SUMMARY

Following the irradiation of rats with 500, 1000 and 1500 rads gamma rays, liver lactate dehydrogenase was partially purified from these animals as well as from normal ones. The study of the reaction catalysed by LDH showed that following the irradiation both the activity and the

enzyme affinity for various substrates decrease as function of irradiation doses. The variation of SH reactive groups is in agreement with the modifications related with irradiation doses. The discrete structural modifications connected with a conformational rigidity might explain the radiation-induced variations of enzyme kinetics.

BIBLIOGRAFIE

1. K.I. ALTMAN, G. B. GERBER, *Radiation Biochemistry*, Academic Press, New York, 1970, p. 129.
2. Z. DIENSTBIER, M. ARIENT, *Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man*, IAEA, Viena, 1972, p. 33.
3. T.C. WELBOURNE, G.B. SPURE, Radiat. Res., **41**, 352 (1970).
4. T.R. HENDERSON, R.K. JONES, Clin. Chem., **16**, 697 (1970).
5. A. KORNBERG, în *Methods of Enzymology*, sub red. G. COLLOWICK, N. KAPLAN, vol. I, Academic Press, New York, 1960, p. 441.
6. W. BIRSCHMEYER, K. WILSON, J. Biol. Chem., **248**, 1751 (1973).
7. R. OLINESCU, C. ULEU, Rev. roum. Biochim., **11**, 283 (1974).
8. J.A. WINSTEAD, T. C. REECE, Radiat. Res., **41**, 125 (1970).
9. H. SCHUESSLER, A. HERGET, Int. J. Radiat. Biol., **17**, 71 (1980).
10. G. DI SABATO, N.O. KAPLAN, Biochim. Biophys. Acta, **77**, 135 (1963).
11. R. OLINESCU, A. VIŞINESCU, Rev. roum. Biochim., **9**, 243 (1972).
12. R. OLINESCU, St. cerc. biochim., **17**, 47 (1974).
13. C.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 268 (1951).

STUDIUL COMPARATIV AL PROPRIETĂŢILOR CATALITICE ALE CELULAZELOR, ÎN STARE LIBERĂ ŞI IMOBILIZATĂ, ELABORATE DE *ASPERGILLUS TERREUS*

LIDIA POPA*, HORST D. SCHELL**, ELENA ENACHE*, LUCIA LEPĂDAT*

Rezumat. Se prezintă condiţiile de cultivare pentru *A. terreus* în vederea obţinerii celulazelor C_1 şi C_x, precum şi unele proprietăţi ale acestor enzime în stare liberă şi imobilizată pe un gel perlat de CM-agaroză reticulată. Prin imobilizare rezultă un preparat enzimatic insolubil, cu o concentraţie proteică de 1,25 mg/ml gel, deosebit de activ (activitatea reziduală C_x fiind de 91 %, iar activitatea reziduală C_1 chiar de două ori mai mare decît cea găsită în filtratul de cultură). Prin imobilizarea filtratului (conţinut proteic 13 mg/ml), pH-ul optim pentru activitatea C_1 rămîne nemodificat la valoarea 4,0, în timp ce în cazul activităţii C_xpH-ul optim se deplasează de la valoarea 1,6 la 2,6. Preparatul imobilizat poate fi refolosit de repetateori şi îşi menţine aceleaşi activităţi catalitce şi după două luni de păstrare suspensie apoasă la 3—4°C.

Celulazele sînt enzime implicate în degradarea hidrolitică a celulozelor şi sînt elaborate în special de bacterii şi fungi. În timp ce la bacterii aceste enzime sînt intracelulare, la fungi ele sînt extracelulare şi eliminate în mediul de cultură pe măsură ce se sintetizează în celula microorganismului.

Conform schemei propuse de Reese (1), transformarea celulozei insolubile în zaharuri solubile (celobioză şi glucoză) se datoreşte acţiunii celulazelor şi celobiazelor. Celulazele cuprind, după cum se ştie, doi factori : factorul C_1 — enzima C_1 — , responsabil de transformarea celulozei native insolubile în celuloză solubilă, formată din lanţuri mai scurte lineare de polianhidroglucoză, şi factorul C_x, responsabil de hidroliza celulozei solubile pînă la celobioză (2)—(5).

Enzimele legate de suporturi insolubile posedă, faţă de cele libere nelegate, o serie de avantaje, dintre care menţionăm în primul rînd posibilitatea refolosirii lor repetate, stabilitatea avansată faţă de diferiţi agenţi de denaturare (temperaturi ridicate, inhibitori etc.), posibilitatea îndepărtării lor complete, rapide şi uşoare din mediul de reacţie (6) — (8). Din aceste motive am considerat util studiul comparativ al unor proprietăţi catalitice ale celulazelor elaborate de *A. terreus*, în stare liberă şi imobilizată ; aceasta mai ales datorită importanţei pe care o prezintă aceste enzime pentru obţinerea de zaharuri fermentescibile din subproduse celulozice, iar pe de altă parte pentru o mai bună asimilaţie a nutreţurilor celulozice de către animalele erbivore.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe culturi de *A. terreus*, folosind ca mediu de cultură fie mediul Czapek-agar alternativ cu mediul de cartof pentru conservarea culturii, fie mediul Czapek lichid, la pH 5,5, în care zaharoza a fost înlocuită cu tărîţe de grîu în concentraţie de 4%(9). Au fost repartizaţi cîte 100 ml mediu de cultură în flacoane Erlenmeyer de 300 ml şi sterilizaţi timp de 30 min la 125°C. Inocularea s-a efectuat cu 5 ml suspensie de spori proveniţi din culturi de *A. terreus*, în vîrstă de 10—14 zile, cultivat pe mediul Czapek-agar. Incubarea a avut loc la 30°C, timp de 4 zile, cu agitare continuă. După trecerea acestui interval de timp, mediul de cultură a fost filtrat. În filtratul obţinut s-a stabilit apoi activitatea enzimatică C_1 şi C_x după indicaţiile date de Radionova şi colab. (10) şi de Taspulatov şi Teslinova (9), determinîndu-se cantitatea de zahăr reducător din mediul de reacţie după metoda colorimetrică Nelson-Somogyi. În acest scop s-a determinat mai întîi în 1,5 ml filtrat de cultură, adus la pH 7,5, cantitatea de zahăr reducător apărut în mediu în urma activităţii ambelor enzime. Apoi s-au determinat separat în condiţiile standard activităţile enzimatice C_1 şi C_x.

Pentru determinarea activităţii C_1 s-a uincubat 1,5 ml filtrat de cultură sau 1 ml gel enzimatic cu o bucată de hîrtie de filtru de 1,5 ×1,5 cm şi 6 ml soluţie tampon de pH adecvat, timp de 24 ore, la 40°C. După incubare, s-a ajustat pH-ul la 7,5 şi s-a determinat cantitatea de zahăr reducător formată.

Pentru determinarea activităţii C_x s-au incubat 0,5 ml filtrat de cultură sau 1 ml gel enzimatic cu 2,5 ml soluţie 1% de sare de sodiu a carboximetilcelulozei şi 0,5 ml tampon de pH adecvat, timp de 60 min, la 50°C. După incubare, s-a ajustat pH-ul la 7,5 şi s-a determinat cantitatea de zahăr reducător formată.

Activităţile celulazice C_1 şi C_x s-au calculat prin scăderea cantităţii de zahăr reducător din mediu din cantitatea de zahăr reducător găsită în probă după incubare. Determinările colorimetrice s-au efectuat la un colorimetru Pulfrich, folosind cuve cu drumul optic L = 5 cm şi filtru 6 (540—550 nm). Activităţile enzimatice C_1 şi C_x s-au exprimat în μg zahăr reducător, raportat la 1 ml filtrat sau gel enzimatic, precum şi la 1 mg proteină.

În vederea stabilirii pH-urilor optime ale activităţilor C_1 şi C_x în stare liberă şi imobilizată, s-au folosit în mediul de reacţie următoarele valori de pH : 1,2 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 ; 6,0 ; 7,0 pentru activitatea C_1 şi 1,2 ; 1,6 ; 2,6 ; 3,6 ; 4,6 ; 5,6 ; 6,6 pentru activitatea C_x, realizate cu soluţii tampon citrat şi soluţii tampon fosfat 0,1 M.

S-a determinat de asemenea şi influenţa temperaturii asupra activităţilor enzimatice C_1 şi C_x, incubînd probele respective şi la temperaturi de 30, 40, 50 şi 60°C şi folosind în mediul de reacţie pH-ul optim de acţiune, situat în cazul enzimei C_1 libere şi legate la pH 4,0, iar în cazul enzimei C_x libere la pH 1,6 şi al C_x imobilizate la pH 2,6.

La imobilizarea celulazelor s-a folosit drept suport insolubil CM-agaroza reticulată, preparată conform procedeului descris de Gheţie şi Schell (11). Practic s-a procedat astfel : 20 ml gel perlat de CM-agaroză reticulată au fost mai întîi trataţi cu 50 ml soluţie HCl 0,1 N şi spălaţi apoi la trompă cu apă distilată pînă la reacţie neutră. În continuare, gelul a fost trecut într-un pahar Berzelius de 100 ml şi tratat atît cu 20 ml filtrat (concentraţia proteică 13 mg/ml) dintr-o cultură de *A. terreus* în vîrstă de 4 zile cultivat pe mediul Czapek (cu 4% tărîţe de grîu), cît şi cu o emulsie proaspăt preparată din 0,5 g diciclohexilcarbodiimidă dizolvată în 3 ml tetrahidrofuran şi 4 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul la 5,0, se omogenizează amestecul de reacţie timp de 15 min şi se lasă la temperatura camerei pînă a doua zi, amestecînd din cînd în cînd. Apoi se filtrează la trompă de apă şi se suspendă conjugatul enzimatic format în 10 ml tetrahidrofuran. Se filtrează din nou la trompă şi se repetă operaţia încă de două ori, după care se spală de două-trei ori cu acetonă, cu 25 ml soluţie 1% de Na_2CO_3, cu aceeaşi cantitate de HCl 0,01 N şi cu apă distilată. Preparatul enzimatic insolubil obţinut se păstrează pînă la folosire suspendat în apă distilată la 3—4°C.

Concentraţia proteică din filtratul de cultură s-a determinat spectrofotometric, iar conţinutul proteic din conjugatul enzimatic prin metoda Parnas în urma kjeldahlizării unei cantităţi cunoscute de gel enzimatic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin imobilizarea filtratului de cultură (concentraţia proteică 13 mg/ml) de la *A. terreus* pe un gel perlat de CM-agaroză reticulată, se obţine un preparat insolubil catalitic activ (concentraţia proteică 1,25 mg/ml gel), care prezintă o activitate reziduală C_x de 91% şi o activitate reziduală

C_1 de două ori mai mare decît cea găsită în filtratul liber, nelegat. Aceste activităţi celulozolitice specifice crescute ale preparatului imobilizat se datoresc, pe de o parte, unei legări selective a celulazelor de suportul insolubil folosit, iar pe de altă parte şi faptului că filtratul de cultură ca atare mai conţine şi o serie de proteine însoţitoare lipsite de activităţi celulozolitice.

Studiind influenţa pH-ului asupra activităţii C_1 a filtratului de cultură în stare liberă şi imobilizată (fig. 1), se constată la ambele preparate

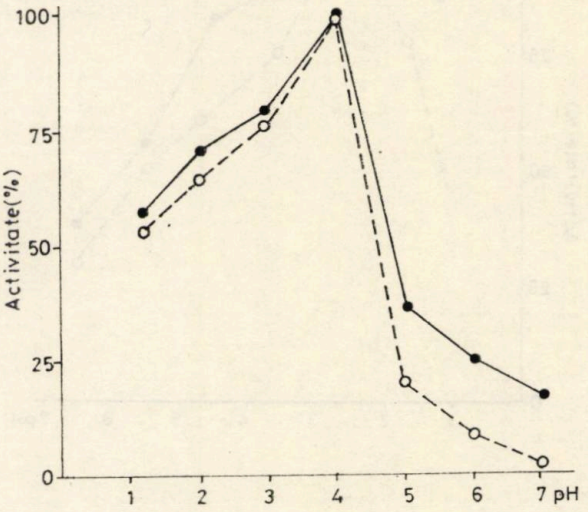


Fig. 1. — Variaţia activităţii celulazei C_1 a filtratului de cultură de la *A. terreus* (● — ●) şi a filtratului imobilizat de CM-agaroză reticulată (o— — —o), în funcţie de pH.

acelaşi pH optim, situat la valoarea 4,0, şi o aliură a curbelor aproape identică, activitatea catalitică micşorîndu-se atît spre valori de pH mai acide, cît şi spre valori mai alcaline ale mediului de reacţie. Înseamnă că prin imobilizare variaţia activităţii C_1, în funcţie de pH, practic nu se modifică.

Urmărind activitatea enzimatică C_x a filtratului legat, în comparaţie cu cel nelegat, în funcţie de diferite valori ale pH-ului, se observă (fig. 2) că prin legare covalentă de suportul insolubil valoarea pH-ului optim de acţiune se deplasează în acest caz de la 1,6 la 2,6, fenomen relativ des întîlnit şi la alte enzime şi datorat influenţei suportului folosit la imobilizare. Se constată şi de data aceasta o micşorare a activităţii catalitice prin scăderea sau mărirea valorilor de pH. Micşorarea activităţii catalitice este însă mai lentă spre domeniul alcalin şi are practic acelaşi aspect pentru preparatul liber şi cel imobilizat.

În figura 3 sînt redate variaţiile activităţilor enzimatice C_1 ale preparatului liber şi imobilizat, în funcţie de temperaturile de reacţie ale mediului. Ambele preparate prezintă aceeaşi temperatură optimă de reacţie, situată la 40°C. Se observă totodată că prin imobilizare apare în acest caz o creştere a termostabibităţii. Astfel, în timp ce preparatul liber îşi micşo-

reazã la 60°C activitatea sa iniţială la 45%, preparatul imobilizat mai prezintă la această temperatură încă o activitate de 80% din cea optimă. Se constată de asemenea că, în timp ce preparatul nelegat prezintă la 30°C doar 50% din activitatea optimă, preparatul imobilizat îşi pierde în aceste condiţii numai 10% din activitatea sa optimă.

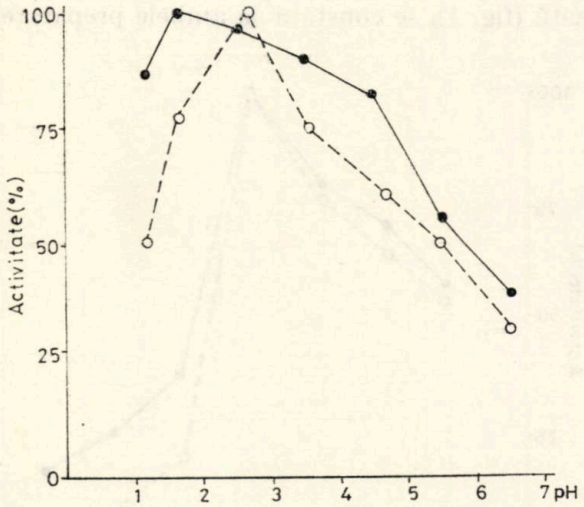


Fig. 2. — Variaţia activităţii celulazei C_x a filtratului de cultură de la *A. terreus* (● — ●) şi a filtratului imobilizat de CM-agaroză reticulată (o— — —o), în funcţie de pH.

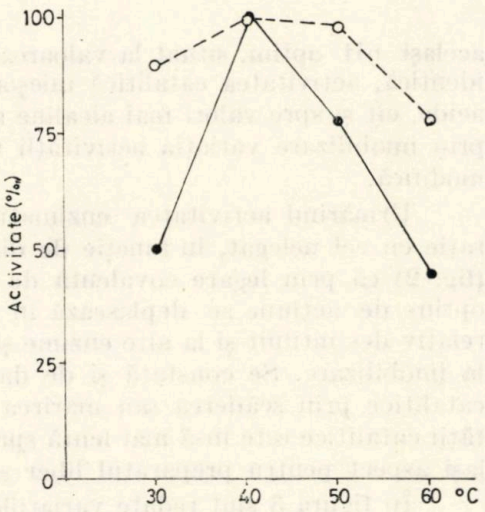


Fig. 3. — Variaţia activităţii celulazei C_1 din filtratul de cultură de la *A. tererus* (● — ●) şi din filtratul imobilizat prin legare covalentă de CM-agaroză reticulată (o— — —o), în funcţie de temperatura de reacţie.

Urmărind influenţa temperaturii de reacţie şi asupra activităţii enzimatice C_x la cele două preparate, se observă din figura 4 că prin imobilizare temperatura optimă de reacţie pentru activitatea C_x scade de la

50°C (filtratul de cultură neimobilizat) la 40°C. În rest, aspectul curbelor activităţilor C_x este aproape identic pentru cele două preparate.

Determinînd activităţile catalitice C_1 şi C_x în funcţie de cantitatea preparatului liber şi imobilizat folosit în reacţie, s-a observat întotdeauna o relaţie lineară între aceste două mărimi.

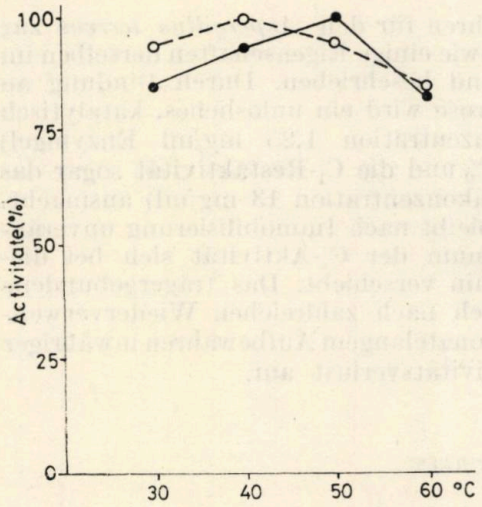


Fig. 4. — Variaţia activităţii celulazei C_x din filtrul de cultură de la *A. terreus* (● — ●) şi din filtratul imobilizat prin legare covalentă de CM-agaroză reticulată (o— — —o), în funcţie de temperatura de reacţie.

Preparatul enzimatic imobilizat ese stabil în timp. După o păstrare de două luni de zile la 3—4°C suspendat în apă distilată, nu şi-a modificat activitatea iniţială.

CONCLUZII

1. Prin cuplarea de CM-agaroza reticulată a celulazelor eliberate de *A. terreus* în mediul de cultură, se obţine un preparat bienzimatic insolubil, care prezintă atît activitate enzimatică C_1, cît şi C_x.

2. Prin imobilizare, activitatea C_1 nu-şi modifică pH-ul optim şi temperatura optimă de acţiune şi devine totodată mai termostabilă.

3. În cazul activităţii C_x, se observă în urma imobilizării o deplasare a pH-ului optim cu o unitate spre domeniul mai slab acid şi o reducere a temperaturii optime de acţiune de la 50 la 40°C.

4. Preparatul enzimatic imobilizat este stabil în timp, menţinîndu-şi activitatea iniţială şi după o păstrare de două luni la 3—4°C în suspensie apoasă.

Prezentat la redacţie
la 11 decembrie 1981

* *Universitatea Bucureşti,*
Facultatea de biologie, Catedra de microbiologie
şi
** *Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti,*
Laboratorul de biologie moleculară

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN DER FREIEN UND TRAGERFIXIERTEN VOM *ASPERGILLUS TERREUS* GEBILDETEN CELLULASEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden das Züchtungsverfahren für den *Aspergillus terreus* zur Erzielung der Cellulasen C_1 und C_x sowie einige Eigenschaften derselben im freien und trägergebundenen Zustand beschrieben. Durch Bindung an perlförmiges Gel vernetzter CM-Agarose wird ein unlösliches, katalytisch aktives Enzympräparat (Proteinkonzentration 1,25 mg/ml Enzymgel) erhalten, dessen C_x-Restaktivität 91% und die C_1-Restaktivität sogar das doppelte des Kulturfiltrates (Proteinkonzentration 13 mg/ml) ausmacht. Das pH-Optimum der C_1-Aktivität bleibt nach Immobilisierung unverändert bei 4,0, während das pH-Optimum der C_x-Aktivität sich bei diesem Anlaß von 1,6 zum Wert 2,6 hin verschiebt. Das trägergebundene Präparat behält seine Aktivität auch nach zahlreichen Wiederverwendungen bei und zeigt auch nach zweimonatelangem Aufbewahren in wäßriger Suspension bei 3—4°C keinen Aktivitätsverlust auf.

BIBLIOGRAFIE

1. E. T. REESE, Biotechnol. Bioeng. Symp., **6**, 9 (1976).
2. M. CARPENTIER, Ann. Inst. Pasteur, **117**, 497 (1968).
3. D. L. CRAWFORD, E. McCOY, Appl. Microbiol., **24**, 150 (1972).
4. S. RUSSEL, Acta Microbiol. Polon., Series B, **6**, 97 (1974).
5. F. J. STUTZENBERGER, Appl. Microbiol., **24**, 77 (1972).
6. P. CUATRECASAS, J. Biol. Chem., **245**, 3056 (1970).
7. H.-J. REHM, *Industrielle Mikrobiologie*, ed. a 2-a, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1980, p. 353.
8. I. CHIBATA, *Immobilized enzymes, research and development*, Halsted Press, New York, 1978.
9. J. TASPULATOV, N. A. TESLINOVA, Mikrobiologhia, **43**, 609 (1974).
10. N. A. RADIONOVA, N. A. TIUNOVA, R. V. FENIKSOVA, I. M. TIMOHIM, M. Z. FINKELSTEIN, L. J. MARTINOVICI, Prikl. biohim. i mikrobiol., **2**, 197 (1966).
11. V. GHEŢIE, H. D. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **7**, 115 (1970).

CARACTERIZAREA LACTAZEI DIN *ASPERGILLUS NIGER*

ANCA ROŞEANU *, MAGDALENA LUNGU *, S. S. VASU **

Rezumat. β-Galactozidaza (lactaza) din *Aspergillus niger* ICA-34 a fost obţinută şi purificată prin precipitare cu acetonă şi prin gel-filtrare pe Sephadex G-100. Enzima prezintă activitate maximă la pH 3,9 şi la temperatura de 60°C. Enzima parţial purificată are proprietatea de a hidroliza lactaza din laptele uman şi cel alimentar.

Glicozidazele produse de diferite microorganisme prezintă importanţă practică, preparate cu astfel de activităţi fiind solicitate în ultimii ani pentru terapia intoleranţelor la unele diglucide (1) şi în industria alimentară (2).

Dintre aceste enzime, de o atenţie mai deosebită s-a bucurat în ultimul timp β-galactozidaza, respectiv lactaza (β-D-galactozid-galactohidrolaza, EC 3.2.1.20).

Lactaza a fost purificată din preparatul comercial Rhozyme HP-150, obţinut din *Aspergillus niger* (3), din culturile de *Aspergillus foetidus* (4) şi recent din *Aspergillus oryzae* (5), (6).

Un preparat lactazic obţinut din *Aspergillus niger*, comercializat de firma Fresenius (Bad-Hamburg, R.F.Germania) sub denumirea „Lactase-500" (7), este recomnadat în terapia intoleranţelor la lactoză, care poate prezenta implicaţii grave mai ales la sugari, pentru care laptele constituie alimentul de bază.

În scopul obţinerii unor preparate lactazice, am urmărit producerea acestei enzime de către unele tulpini din genul *Aspergillus* (8), selectînd ca bun producător de lactază *Aspergillus niger* ICA-34.

În prezenta lucrare, redăm rezultatele privind obţinerea unui preparat lactazic parţial purificat din cultura de *Aspergillus niger* şi unele caractristici ale acestui preparat.

MATERIAL ŞI METODE

Obţinerea culturilor de *Aspergillus niger*. Culturile de *Aspergillus niger* ICA-34 s-au obţinut în condiţiile stabilite anterior (8), pe un mediu de tărîţe de grîu (200 g tărîţe şi 240 ml apă de la robinet) sterilizat la 1,5 atm, timp de 30 min ; mediul steril a fost însămînţat cu 10^7 spori de *Aspergillus niger*/250 g mediu şi incubat timp de 5 zile la 30°C.

Preluerarea culturilor. Culturile mărunţite şi suspendate în apă distilată, în proporţie de 1 :10 (g/v), au fost agitate la temperatura camerei timp de 4 ore. Suspensia astfel obţinută s-a filtrat şi centrifugat, obţinîndu-se extractul enzimatic brut.

Determinarea activităţii lactazice. Activitatea lactazică s-a determinat după metoda lui Burton (9), mediul de reacţie conţinînd 600 μmoli lactoză şi enzima în 5,0 ml tampon citrat-

fosfat 0,1 M, pH 3,9. Reacția enzimatică se întrerupe după 15 min de incubare la 60°C, prin fierbere timp de 2 min.

La 0,5 ml sistem de reacție se adaugă 1,0 ml reactiv OPG (ortodianisidină-peroxidază-glucozoidază) și se incubă timp de 5 min la 30°C. Se adaugă apoi 2,0 ml H_2SO_4 10 N și se citește la 525 nm față de martor de reactivi. Glucoza eliberată în urma acțiunii lactazei se calculează folosind o curbă standard, stabilită în aceleași condiții experimentale.

O unitate de activitate lactazică este cantitatea de enzimă care produce 1 μmol de glucoză/ml min/60°C.

Concentrația proteică. În preparatele enzimatice, concentrația proteică s-a determinat prin metoda Lowry (10), folosind albumina serică bovină (BDH), ca proteină standard.

Purificarea parțială a lactazei. a) *Precipitarea cu acetonă.* Extractul proteic total a fost supus precipitării fracționate cu acetonă rece. Precipitatul astfel obținut a fost reluat în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 5,0.

b) *Gel-filtrarea pe Sephadex G-100 și pe Sephadex G-200.* După precipitarea cu acetonă, o soluție enzimatică conținînd 80 mg proteină a fost aplicată pe o coloană de Sephadex G-100 (3 × 100 cm) sau Sephadex G-200 (3 × 100 cm), echilibrate în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 5,0. Coloanele au fost eluate în același tampon, culegîndu-se fracțiuni a cîte 5,0 ml. În toate fracțiunile s-au determinat atît activitatea lactazică, cît și Do la 280 nm. Fracțiunile cu activitate lactazică au fost reunite, concentrate și liofilizate.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă. Electroforeza s-a realizat în gel de poliacrilamidă 7,5% după metoda lui Ornstein și Davis (11), aplicîndu-se un curent de 3 mA/tub, timp de 2,5—3 ore. Fracțiunile proteice s-au evidențiat prin colorare în Coomassie Blue soluție 0,3% în metanol : acid acetic : apă (20 : 10 : 70). Gelurile s-au păstrat în soluție de acid-acetic 5%.

pH-ul optim și temperatura optimă. Pentru determinarea pH-ului optim de acțiune al lactazei, hidroliza lactozei a fost efectuată la 60°C, utilizînd tampon citrat-fosfat 0,1 M pentru intervalul de pH 2,5—7,0.

Temperatura optimă s-a determinat urmărind activitatea enzimei în intervalul de temperatură 30—65°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Purificarea parțială a lactazei din *Aspergillus niger*

Culturile de *Aspergillus niger* ICA-34, crescute 5 zile la 30°C, au fost extrase cu apă distilată, obținîndu-se extractul enzimatic brut, care a fost supus precipitării fracționate cu acetonă la rece.

O parte din pudra acetonică obținută a fost relaută în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 5,0 și trecută (80 mg proteină) pe o coloană de Sephadex G-100 (3 × 100 cm).

Eluînd cu același tampon, s-au colectat fracțiuni de cîte 5 ml, care au fost testate din punctul de vedere al activității lactazice și al conținutului în proteină (fig. 1). Comparativ, a fost experimentată în aceleași condiții și gel-filtrarea pe o coloană de Sephadex G-200 (3 × 100 cm) (fig. 2).

După cum rezultă din figurile 1 și 2, prin gel-filtrarea pe Sephadex G-100 și pe Sephadex G-200, fracțiunile cu activitate lactazică formează un singur maxim de eluție. Cum viteza de curgere prin coloana de Sephadex G-200 este mai mică decît prin coloana de Sephadex G-100, iar activitățile enzimatice specifice sînt apropiate (tabela 1), ne-am oprit pentru purificarea parțială a lactazei la filtrarea prin gel de Sephadex G-100.

Acritvitatea lactazică a preparatelor brute și parțial purificate, obținute din cultura de *Aspergillus niger* ICA-34 (tabela 1), indică pentru

preparatele purificate cu acetonă şi gel- filtrare o activitate specifică apropiată de cea a preparatului comercial „Lactase-500" (7). Totodată, urmărind procesul de purificare prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (fig. 3), se constată că numărul şi intensitatea fracţiunilor proteice scad de la o etapă a purificării la alta, ajungînd după gel-filtrare la un număr de 3—4 fracţiuni proteice, la fel ca în cazul produsului comercial „Lactase-500".

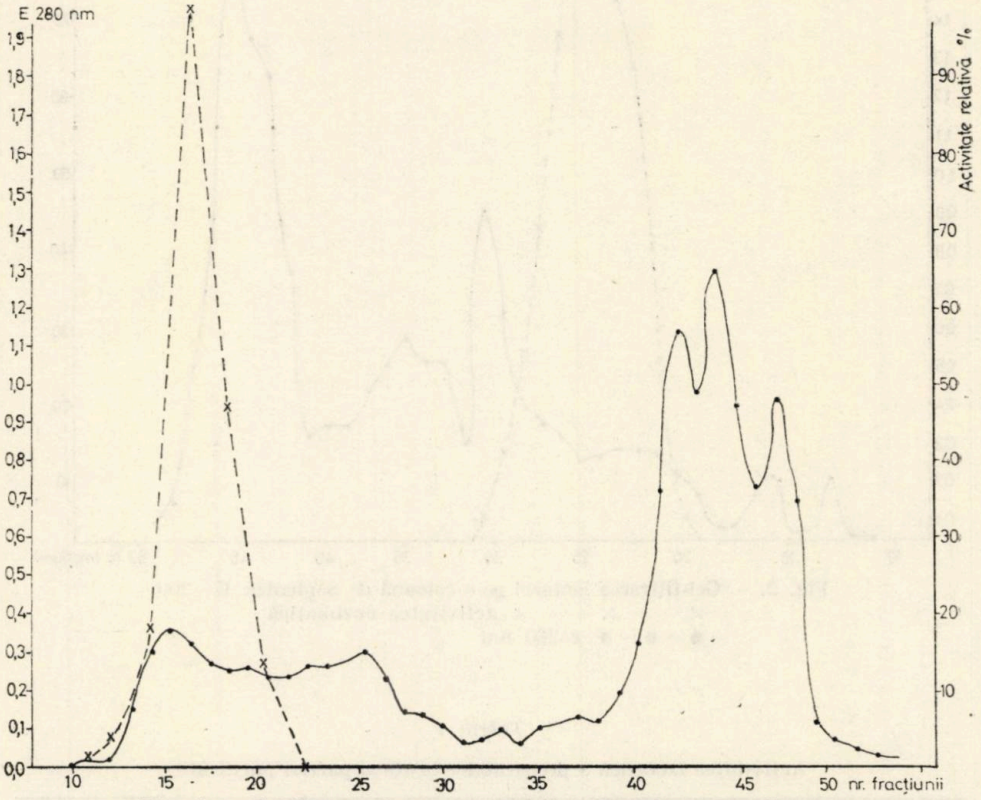


Fig. 1. — Gel-filtrarea lactazei pe o coloană de Sephadex G—100.
— — × — — × — — × — — activitatea enzimatică
● — ● — ● — ● ε 280 nm

Proprietăţile cinetice ale lactazei

Concentraţia optimă de enzime. Într-o primă etapă ne-am preocupat de stabilirea concentraţiei lactazei din sistemul de reacţie, pentru asigurarea unei directe proporţionalităţi între activitatea şi cantitatea de enzimă.

Se observă, din figura 4, că de la 18 pînă la 166 μg proteină enzimatică în sistemul de reacţie proporţionalitatea concentraţiei enzimatică—actiitate enzimatică este respectată, ceea ce ne-a determinat ca în experienţele anterioare să ne încadrăm în acest interval de concentraţie enzimatică.

Concentraţia optimă de substrat. Folosind lactoză în diferite concentraţii, de la 50 la 700 μmoli /sistem de reacţie,s-a urmărit activitatea lac-

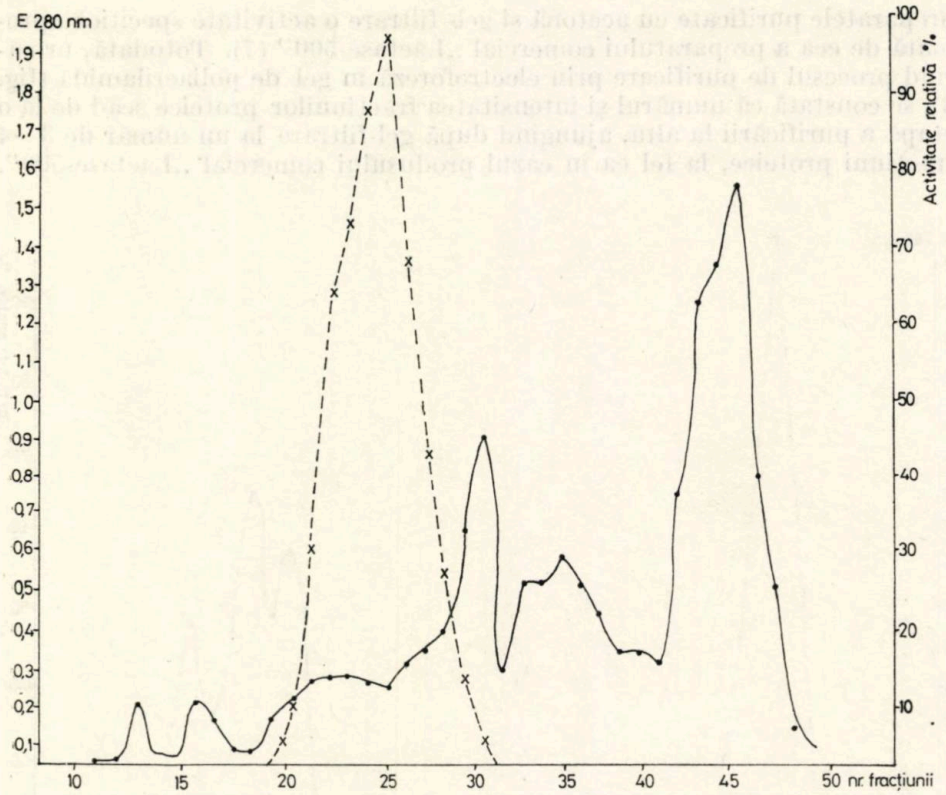


Fig. 2. — Gel-filtrarea lactazei pe o coloană de Sephadex G—200.
× — — × — — × activitatea enzimatică
● — ● — ● ε 280 nm

Tabela 1

Activitatea lactazică a preparatelor brute și parțial purificate

Etapa de purificare	Activitatea lactazică (μmoli glucoză/ml/min)	Proteină (mg/ml)	Activitatea specifică (μmoli glucoză /mg/proteină)
Extract brut	1,48	4,50	0,34
Precipitarea cu acetonă	1,00	0,36	2,70
Gel-filtrarea pe Sephadex G—100	1,02	0.20	5.25
Gel-filtrarea pe Sephadex G—200	0,92	0,17	5,70
Lactase—500	2.00	0.30	7.00

tazică (fig. 5). Concentrația optimă obținută este de 600 μmoli lactoză/sistem de reacție, valoare folosită anterior.

pH-ul optim. A fost studiat efectul pH-ului asupra activității enzimatice, incubînd enzima și substratul la 60°C, în tampon citrat-fosfat 0,1

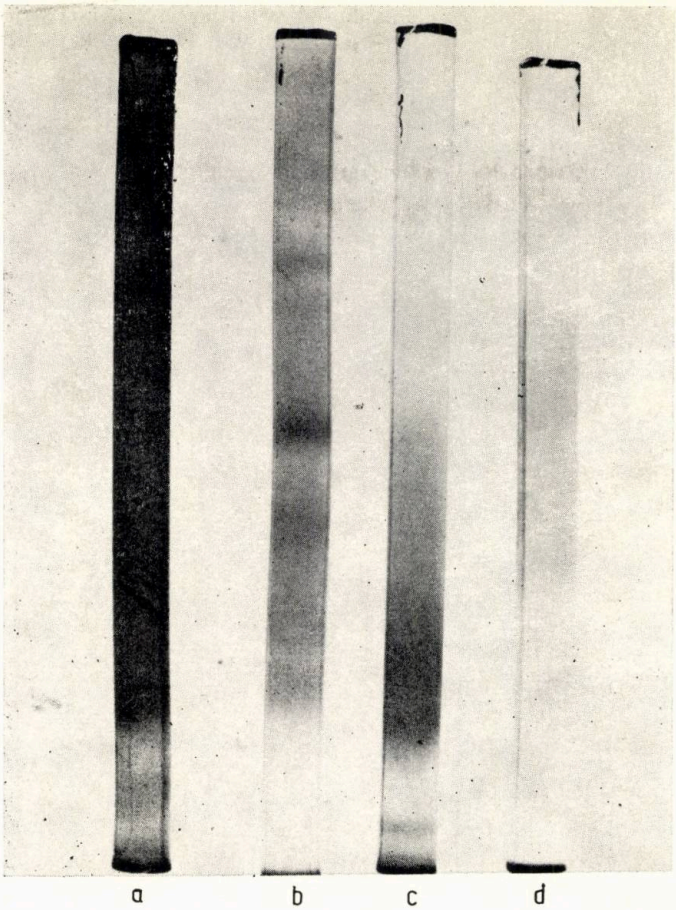


Fig. 3. — Electroforegrama produșilor obținuți în diferitele etape de purificare : *a*, *Aspergillus niger* — extract brut, *b*, precipitare cu acetonă, *c*, gel-filtrare pe Sephadex G—100, *d*, Lactase—500.

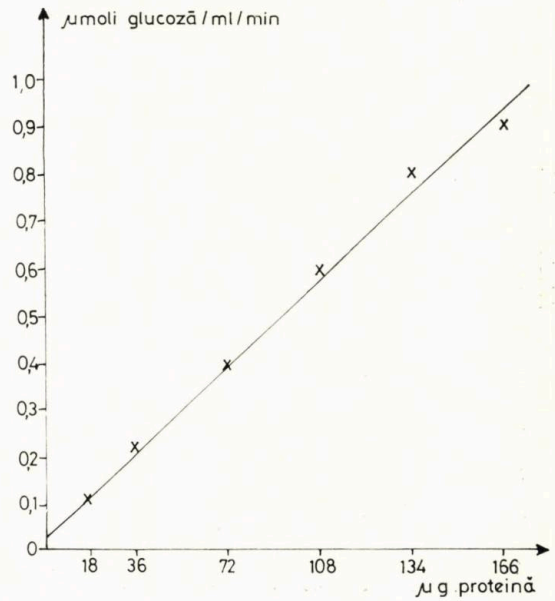


Fig. 4. — Efectul concentrației de enzimă asupra activității enzimatice.

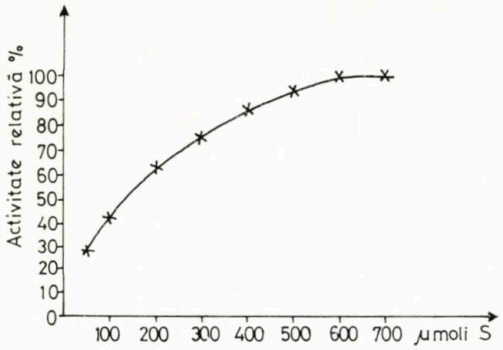


Fig. 5. — Efectul concentrației de substrat asupra activității enzimatice.

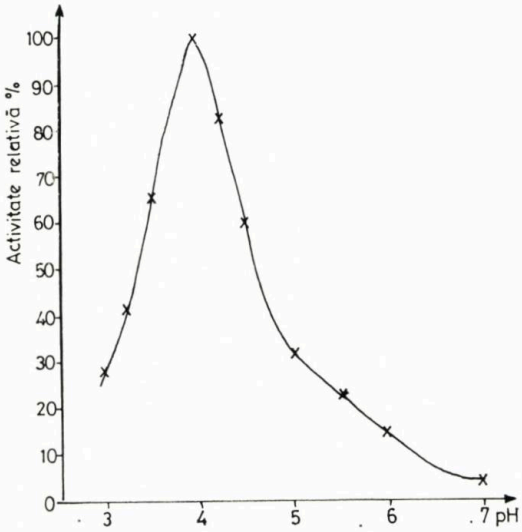


Fig. 6. — Efectul pH-ului asupra activității enzimatice.

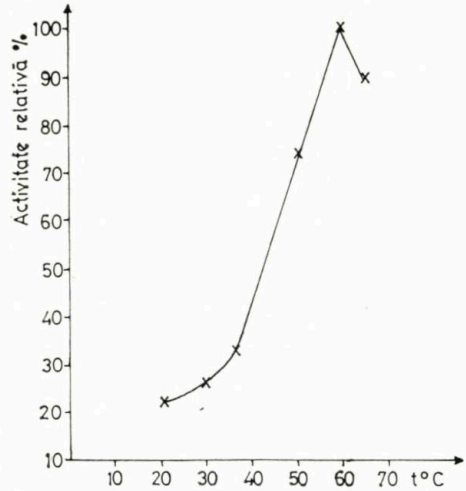


Fig. 7. — Efectul temperaturii asupra activității enzimatice.

M, pH 2,5—7,0. Dependența activității enzimatice de pH (fig. 6) indică un pH optim de 3,9—4,0, fapt constatat și de Bahl și Agrawal (3), precum și de Lee și Wacek (12) pentru enzima din *Aspergillus niger* C-15.

Efectul temperaturii asupra activității enzimatice. Din figura 7 se observă că maximul de activitate se obține la 60°C, valori mai mari pro-

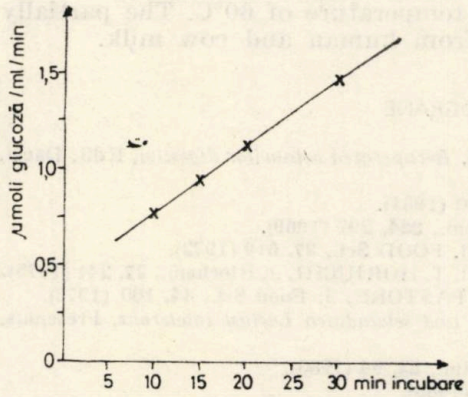


Fig. 8. — Efectul timpului de incubare asupra activității enzimatice.

ducînd scăderi ale activității enzimatice. De remarcat că temperaturi optime de acțiune ridicată au fost semnalate și pentru lactaza din *Aspergillus foetidus* (13) sau *Aspergillus oryzae* (6).

Efectul timpului de incubare. Sistemul lactoză-lactază, incubat la 60°C, timpi diferiți (fig. 8), a indicat o directă proporționalitate între activitatea enzimei și timpul de incubare pe o perioadă de 30 min.

CONCLUZII

1. Lactaza din *Aspergillus niger* ICA-34 a fost purificată parțial prin precipitare cu acetonă și gel-filtrare.

2. Preparatorul lactazic parțial purificat are o activitate specifică apropiată de cea a produsului comercial „Lactase-500".

3. Electroforeza în gel de PAA indică prezența a 3—4 fracțiuni proteice atît în preparatul lactazic parția purificat, cît și în „Lactase--500".

4. Studiile cinetice au indicat pentru lactaza din *Aspergillus niger* un pH optim de 3,9, o temperatură optimă de 60°C și o concentrație optimă de substrat de 600 µmoli.

5. Lactaza parțial purificată din *Aspergillus niger* hidrolizează lactaza din laptele uman și alimentar.

Prezentat la redacție
la 7 decembrie 1981

* *Institutul de științe biologice, București*
și
** *Universitatea Galați*

THE CHARACTERIZATION OF LACTASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

SUMMARY

ß-Galactosidase (lactase) has been purified from cultures of *Aspergillus niger* ICA-34, by acetone-fractionation and Sephadex G-100 gel-filtration. The enzyme showed an optimum activity at pH 3.9 with lactose as substrate and at on optimum temperature of 60°C. The partially purified enzyme hydrolyzes lactase from human and cow milk.

BIBLIOGRAFIE

1. O. FODOR, F. MARIN, D. DUMITRESCU, *Recuperarea bolnavilor digestivi*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1978, p. 103.
2. Y. O. POMERANZ, Food Technol., **16**, 690 (1964).
3. P. BAHL., K. A. AGRAWAL, J. Biol. Chem., **224**, 297 (1969).
4. G. B. BORGHUM, M. Z. STERIVHERG, J. FOOD Sci., **37**, 619 (1972).
5. Y. TANAKA, A. KAGAMUSHI, A. KIUCHI, T. HORIUCHI, J. Biochem., **77**, 241 (1975).
6. Y. K. PORK, M. S. I. DE SARITI, G. M. PASTORE, J. Food Sci., **44**, 100 (1979).
7. *Lactase-500 — Zur Behandlung der primaren und sekundaren Lactase intoleranz*, Fresenius, Bad, Hamburg.
8. A. ROŞEANU, S. S. VASU, St. cerc. biochim., **23**, 69 (1980).
9. R. R. BURTON, Anal. Biochem., **14**, 258 (1966).
10. H. O. LOWRY et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1952).
11. L. ORNSTEIN, B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321 (1964).
12. Y. C. LEE, V. WACEK, Arch. Biochim. Biophys., **138**, 264 (1970).
13. L. E. WIERZHICKY, F. V. KOSIKOVSKI, J. Dairy Sci., **56**, 26 (1973).

STUDIUL PROPRIETĂŢILOR PROTEAZELOR NEUTRE ŞI ALCALINE ÎN STARE LIBERĂ ŞI IMOBILIZATĂ, ELABORATE DE *BACILLUS SUBTILIS*

HORST D. SCHELL *, LIDIA POPA **, DONCA NICULESCU-MIZIL **, MONIQUE ANDRIANTSIMIAVONA **

Rezumat. Se prezintă modul de obţinere a proteazelor neutre şi alcaline în culturi de *Bacillus subtilis* şi unele proprietăţi ale acestora în stare liberă şi imobilizată pe un gel perlat de CM-agaroză reticulată. Activitatea proteolitică a filtratului bacterian indică prezenţa a două maxime, situate la pH 7,0 şi 11,0, care corespund proteazei neutre, respectiv celei alcaline. Prin imobilizare se observă că, în timp ce proteaza neutră îşi păstrează pH-ul ei optim de acţiune, cea alcalină, îşi modifică valoarea optimă de pH de la 11,0 la 10,0. În urma imobilizării, ambele tipuri de proteaze devin mai termostabile, pot fi refolosite de repetate ori şi păstrate în timp fără să-şi piardă activitatea iniţială.

Sistemul enzimatic proteolitic la numeroase specii de bacterii este reprezentat de două tipuri de enzime, şi anume enzime proteolitice care hidrolizează gelatina şi cazeina şi enzime care coagulează laptele.

Majoritatea enzimelor proteolitice elaborate de bacterii sînt endopeptidaze extracelulare, eliberate în mediu pe măsura sintetizării lor (1).

Se cunosc astăzi diferite specii bacteriene ca fiind surse bogate de enzime proteolitice, cum sînt bacteriile aparţinînd genurilor *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Actinomyces* şi *Streptomyces* (2) — (9).

Dintre toate bacteriile din genul *Bacillus*, tulpinile de *Bacillus subtilis* sînt foarte active, fiind folosite frecvent în producerea pe scară industrială a enzimelor proteolitice. *Bacillus subtilis* elaborează două endopeptidaze extracelulare, care se deosebesc între ele prin pH-ul optim de acţiune, şi anume o protează alcalină cu pH optim 10,5—11,0 şi o protează neutră cu pH optim 7,0 (10). Proteaza alcalină, denumită şi subtilizină, a fost obţinută în stare cristalină şi este folosită pe scară largă în industriile alimentară, textilă şi farmaceutică, avînd o activitate proteoliică şi o specificitate mult mai mare decît a pepsinei şi tripsinei (10).

Lucrarea de faţă îşi propune studiul unor proprietăţi ale proteazelor neutre şi alcaine elaborate de tulpina de *B. subtilis*, comparativ în stare liberă şi imobilizată pe CM-agaroză reticulată.

MATERIAL ŞI METODE

Cultura bacteriană. *Bacillus subtilis* 6633 folosit a provenit din colecţia Laboratorului de microbiologie al Facultăţii de biologie a Universităţii Bucureşti. Această cultură a fost luată în studiu deoarece s-a arătat, într-o lucrare anterioară (11), că este cea mai bună dintr-un număr de tulpini de *B. subtilis* testate.

Medii de cultură. S-au folosit : a) geloză nutritivă, pentru întreţinerea culturii microbiene ; b) bulion de carne peptonat, ca mediu de inoculum ; c) bulion-zaharoză-săruri minerale (BZN), ca mediu de experienţă, cu următoarea compoziţie : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,8 g) ; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (1,4 g) ; $NaNO_3$(1,2 g) ; KCl(0,15 g) ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05 g) ; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (0,034 g) ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,009 g) ; zaharoză (30 g) ; apă distilată (1 000 ml) ; bulion 10‰. Mediul respectiv s-a sterilizat la 115°C, 20 min, fără bulion, după care s-a adăugat bulionul steril ; mediul astfel obţinut s-a repartizat în mod steril în pahare Erlenmeyer de 300 ml, cîte 100 ml în fiecare (6).

Determinarea activităţii proteolitice s-a făcut după metoda Kunitz (12), folosind ca substrat cazeină Hammarsten. Substratul s-a pregătit în felul următor : 800 mg cazeină Hammarsten s-au dizolvat în 20 ml apă distilată şi s-au adăugat 7 ml soluţie NaOH 0,1 N, amestecul menţinîndu-se timp de 30 min la 45°C. Ulterior s-a ajustat la pH 7,0 cu HCl şi s-a completat pînă la 100 ml cu apă distilată (13).

S-a procedat după cum urmează : un volum de 0,25 ml filtrat de cultură s-a introdus în tuburi de centrifugă adăugîndu-se 0,75 ml tampon corespunzător. Tuburile s-au plasat pe baie de apă la 35°C, adăugîndu-se în fiecare cîte 1 ml soluţie de cazeină, şi s-au menţinut timp de 20 min. S-au adăugat ulterior 3 ml acid tricloracetic 5% în fiecare tub şi s-a amestecat. Tuburile au fost scoase din baie şi după o oră s-au centrifugat la 4 000 rotaţii/min 20 min. Densitatea optică a supernatantului s-a citit la 280 nm faţă de martor, care se prepară din 1 ml soluţie cazeină, 1 ml tampon şi 3 ml soluţie acid tricloracetic 5%.

Pentru determinarea activităţii proteolitice a gelului enzimatic s-a lucrat la fel, folosindu-se 0,5 ml gel enzimatic suspendat în 1 ml tampon corespunzător, cu deosebirea că după incubare la 35°C amestecul de reacţie s-a filtrat. În filtrat s-a adăugat o soluţie de acid tricloracetic 5%, lucrîndu-se în continuare ca şi în cazul determinărilor din filtratul de cultură. Gelul enzimatic recuperat prin filtrare poate fi refolosit după spălare.

Obţinerea culturii bacteriene. Dintr-o cultură de *B. subtilis* 6633 pe geloză nutritivă, în vîrstă de 24 de ore, s-a făcut o însămînţare pe mediul de inoculum (bulion). După 24 de ore de incubare la 30°C cultura obţinută pe bulion a servit ca inoculum pentru mediul de experienţă (BZM), însămînţat cu 10% inoculum. După 6 zile de incubare la 30°C, cultura obţinută a fost filtrată mai întîi prin hîrtie de filtru şi ulterior prin filtru bacteriologic G_5. Filtratul obţinut a fost păstrat la frigider, la 4°C, în bune condiţii, timp de o lună de zile. Acest filtrat, care conţinea proteazele alcalină şi neutră, a servit pentru determinările de activitate enzimatică şi pentru imobilizarea enzimelor pe suportul solid.

Determinarea concentraţiei proteice a filtratului a fost efectuată prin spectrofotometrare la 280 nm, după o prealabilă diluare 1 : 10 sau 1 : 20.

Imobilizarea proteazelor din filtrat pe CM-agaroză reticulată. Metoda de imobilizare folosită a constat în legarea covalentă a proteazelor pe suportul insolubil. Acest mod de cuplare prezintă avantajul că enzimele odată legate nu se mai desprind de suportul insolubil nici la modificări mari de pH sau de forţă ionică. Suportul insolubil folosit a fost carboximetil-agaroza (CM-agaroza) reticulată, în stare perlată (14), (15). Pentru legarea enzimelor de acest suport s-a procedat în modul următor : 20 ml gel perlat s-au spălat cu 50 ml HCl 0,1 N, apoi cu apă distilată la neutru, s-au tras la trompă şi s-au introdus într-o capsulă cu capac, în care s-au adăugat 10 ml filtrat enzimatic şi, în final, 0,4 g diciclohexil-carbodiimidă (BDH) dizolvată în 1,5 ml tetrahidrofuran (Fluka AG) şi emulsionată cu 3 ml apă distilată. După 15 min de agitare s-a lăsat mediul de reacţie timp de 48 de ore la temperatura camerei, agitîndu-se din cînd în cînd. Conjugatul obţinut s-a suspendat apoi în 10 ml tetrahidrofuran pentru îndepărtarea din mediul de reacţie a compuşilor insolubili în apă, s-a filtrat la trompă, repetîndu-se operaţia de două ori. Tetrahidrofuranul, fiind insolubil în apă, s-a îndepărtat prin spălare cu acetonă. Conjugatul s-a spălat apoi cu 50 ml soluţie Na_2CO_3 0,1 M, de două ori cu soluţie de HCl 0,01 N şi de cîteva ori cu soluţie fiziologică (pH 7,2). Cantitatea de proteină din gelul enzimatic s-a estimat prin determinarea azotului proteic după metoda Kjeldahl-Parnas-Wagner.

În continuare s-au urmărit activităţile proteolitice ale enzimelor libere (din filtratul de cultură) şi ale celor imobilizate, în funcţie de pH şi de temperatură. Pentru studiul influenţei pH-ului s-au folosit tampon acetat-veronal pentru pH 6,0 ; 7,0 şi 8,0 şi tampon glicină-NaOH pentru pH 9,0 ; 10,0 ; 11,0 ; 12,0 şi 13,0. Pentru studiul influenţei temperaturii s-a urmărit activitatea enzimatică la temperaturi de 35, 45, 55, 65 şi 75°C, la pH 7,0 şi 11,0. De asemenea s-au urmărit stabilitatea în timp şi capacitatea de refolosire a preparatelor de enzime imobilizate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute în studiul influenţei pH-ului asupra activităţii proteolitice a filtratului culturii de *B. subtilis* 6633 sînt date în figura 1, în comparaţie cu rezultatele obţinute pe un preparat imobilizat al filtratului legat de CM-agaroză reticulată.

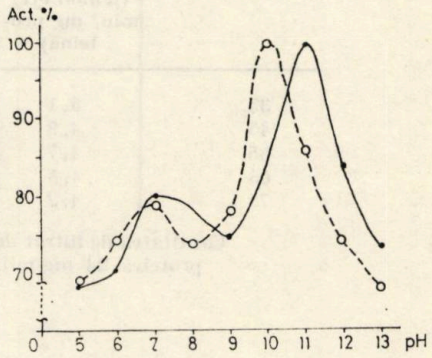


Fig. 1. — Influenţa valorii de pH asupra activităţii proteolitice a filtratului culturii de *Bacillus subtilis* 6633 în stare liberă (● —— ●) şi imobilizată (o— — —o). La determinare s-au folosit cîte 0,25ml filtrat (concentraţia proteică 20 mg/ml) şi, respectiv, 0,5 ml gel enzimatic (concentraţia proteică 1,25 mg/ml) în probă.

Se observă că activitatea proteolitică prezintă două maxime, în funcţie de pH : unul situat la valoarea 7,0, atît pentru preparatul liber cît şi pentru cel imobilizat, care corespunde proteazei neutre, şi altul mai mare, la valoarea 11,0 pentru enzima liberă şi la valoarea 10,0 pentru enzima legată, care corespunde proteazei alcaline. Se mai constată că, în timp ce pentru proteaza neutră optimul de activitate se menţine la pH 7,0 atît pentru enzima liberă cît şi pentru cea legată, pentru proteaza alcalină optimul de activitate se află la pH 11,0 pentru enzima liberă, acest optim deplasîndu-se cu o unitate, adică la pH 10,0 spre domeniul acid pentru enzima legată. Această deplasare a pH-ului optim de activitate este un fenomen des întîlnit în cazul enzimelor imobilizate şi se datorează de regulă influenţei suportului folosit pentru imobilizarea enzimei.

Rezultatele obţinute privind influenţa temperaturii asupra activităţii proteolitice din filtratul culturii de *B. subtilis* 6633 (enzime libere) şi din gelul enzimatic (enzime imobilizate) sînt prezentate în tabelele 1 şi 2.

Se observă că atît proteaza alcalină liberă, cît şi cea neutră liberă prezintă, odată cu creşterea temperaturii, o scădere treptată a activităţii enzimatice, astfel încît la 75°C proteaza neutră îşi pierde 18% iar cea alcalină 20% din activitatea iniţială. Spre deosebire de enzimele libere, cele imobilizate prin legare de CM-agaroză devin rezistente faţă de influenţa temperaturii, fapt constatat la majoritatea enzimelor imobilizate.

Imobilizarea are deci un efect de stabilizare faţă de acţiunea denaturantă a temperaturii. Aşa cum se constată din tabela 2, la temperaturi mai ridicate, proteazele imobilizate nu numai că nu îşi pierd din activitate dar prezintă chiar o creştere a acesteia. Această activare este mai pronunţată la proteaza alcalină, unde activitatea proteolitică creşte la 75°C cu 42% faţă de activitatea prezentată la 35°C. Pentru proteaza neutră, această creştere este mai redusă (25%).

Tabela 1

Influenţa temperaturii de reacţie asupra activităţii proteolitice din filtratul culturii de *B. subtilis* 6633 (proteaze libere)

Temperatura (°C)	pH 7,0		pH 11,0	
	Activitatea proteolitică (μ moli tyr/ min/ mg proteină)	Activitatea catalitică (%)	Activitatea proteolitică (μ moli tyr/ min/ mg proteină)	Activitatea catalitică (%)
35	5,1	100,0	5,0	100,0
45	4,9	96 0	4,8	96,0
55	4,7	92 1	4,6	92,0
65	4,5	90,0	4,2	84,0
75	4,2	82,3	4,0	80,0

Cantitatea de filtrat de cultură luată în determinare : 0,25 ml (concentraţia proteică 24 mg/ml).

Tabela 2

Influenţa temperaturii de reacţie asupra activităţii proteolitice a preparatului imobilizat rezultat din cuplarea filtratului de cultură de *B. subtilis* 6633 de CM-agaroză reticulată (proteaze imobilizate)

Temperatura (°C)	pH 7,0		pH 10,0	
	Activitatea proteolitică (μ moli tyr/ min/ mg proteină)	Activitatea catalitică (%)	Activitatea proteolitică (μ moli tyr/ min /mg proteină)	Activitatea catalitică (%)
35	4,8	100,0	5,6	100,0
45	5,2	108,3	6,0	107,1
55	5,5	114,5	6,4	114,2
65	5,8	120,8	7,1	126,7
75	6,0	125,0	8,0	142,8

Cantitatea de gel enzimatic luat în determinare : 0,5 ml (concentraţia proteică 0,25 mg/ml gel).

Activitatea proteolitică reziduală specifică a proteazelor imobilizate este în mod surprinzător foarte crescută (94 % în cazul proteazei neutre şi chiar 112 % în cazul proteazei alcaline) în comparaţie cu valorile respective găsite în filtratul de cultură. Aceste valori ridicate ale activităţilor catalitice reziduale se pot datora atît unei legări selective de suportul insolubil folosit a proteazelor din filtrat, cît şi faptului că filtratul de cultură pe care s-au determinat activităţile proteolitice specifice mai conţine şi o serie de proteine, balast, lipsite de activitate proteolitică.

Unul din avantajele enzimelor imobilizate constă în faptul că pot fi folosite de mai multe ori fără să-şi reducă considerabil activităţile lor enzimatice. Determinînd capacitatea de refolosire în cazul preparatului nostru imobilizat, s-a constatat că proteazele insolubilizate îşi păstrează

practic neschimbată activitatea enzimatică după numeroase refolosiri. De asemenea s-a putut constata o stabilitate bună în timp a preparatului imobilizat, care, după două luni de păstrare la 4°C, îşi menţine practic nemodificate activităţile enzimatice iniţiale.

CONCLUZII

1. Filtratul de cultură obţinut de la *Bacillus subtilis* (concentraţie proteică 24 mg/ml) prezintă două maxime de activitate proteolitică : unul situat la pH 7,0 (proteaza neutră) şi altul la pH 11,0 (proteaza alcalină).

2. Prin imobilizarea filtratului de cultură pe CM-agaroză reticulată se obţine un preparat enzimatic activ cu un conţinut proteic de 1,25 mg/ml gel.

3. Prin imobilizare se constată la proteaza alcalină o deplasare a pH-ului optim de activitate la valoarea 10,0 faţă de 11,0, cît este la enzima liberă, în timp ce pH-ul optim de activitate la proteaza neutră se menţine nemodificat la valoarea 7,0.

4. Atît proteaza alcalină cît şi cea neutră în stare liberă sînt sensibile la acţiunea temperaturii, observîndu-se o scădere treptată a activităţii enzimatice odată cu creşterea temperaturii.

5. Imobilizarea are ca efect o stabilizare faţă de acţiunea denaturantă a temperaturii, astfel că, la temperaturi mai ridicate, proteazele imobilizate nu numai că nu îşi pierd din activitate, dar chiar se constată o activare a lor ; această activare este mai mare la proteaza alcalină decît la cea neutră.

6. S-a observat o stabilitate bună a preparatului enzimatic imobilizat în timp. Astfel, prin păstrare timp de două luni la 4°C, acesta şi-a menţinut practic neschimbată activitatea iniţială.

7. Preparatul enzimatic insolubil poate fi folosit de repetate ori fără să-şi piardă activitatea iniţială.

Prezentat la redacţie
la 7 decembrie 1981

* *Institutul de ştiinţe biologice,*
Laboratorul de biologie moleculară,
Bucureşti 17,
77748, Splaiul Independenţei nr 296
şi
** *Universitatea Bucureşti,*
Facultatea de biologie,
Catedra de microbiologie

EIGENSCHAFTEN DER FREIEN UND TRÄGERGEBUNDENEN VOM *BACILLUS SUBTILIS* GEBILDETEN NEUTRALEN UND BASISCHEN PROTEASEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden das Züchtungsverfahren von *Bacillus subtilis* zur Erzielung neutraler und basischer Proteasen sowie einige Eigenschaften derselben in freiem und trägergebundenem Zustand vorgestellt. Die proteolytische Aktivität des Kulturfiltrates weist zwei Aktivitätsmaxima auf,

die bei pH 7,0 bzw. 11,0 liegen und der neutralen bzw. basischen Protease entsprechen. Durch Bindung an perlförmiges Gel vernetzter CM-Agarose verschiebt sich das pH-Optimum der basischen Protease um eine Einheit von 11,0 auf 10,0, während die neutrale Protease ihr pH-Optimum unverändert beibehält (pH 7,0). Als Folge der Immobilisierung wächst die Wärmebeständigkeit beider Ensyme, auch können sie zu wiederholten Malen wiederverwendet werden und behalten ihre Aktivität auch nach längerer Aufbewahrungszeit (2 Monate) unverändert bei.

BIBLIOGRAFIE

1. A. H. ROSE, *Industrial Microbiology*, Butterworths, London, 1961, p. 218.
2. A. F. ABDEL-FATTAH, N. M. EL-HAWWARY, A. S. AMR, Acta Microbiol. Pol., **6**(B 1) 27 (1974).
3. A. F. ABDEL-FATTAH, N. M. EL-HAWWARY, A. S. AMR, J. Gen. Microbiol., **84**, 327, (1971).
4. J. FABIAN, Folia Microbiol., **15**, 161 (1970).
5. J. FABIAN, Folia Microbiol., **15**, 169 (1970).
6. Y. E. MICHEL, Folia Microbiol., **20**, 297 (1967).
7. J. W. PAYNE, J. Gen. Microbiol., **71**, 259 (1972).
8. L. E. RAY, F. W. WAGNER, Canad. J. Microbiol., **18**, 853 (1972).
9. J. SINGH, B. RANGANATHAN, Acta Microbiol. Pol., **6** (B1), 15 (1974).
10. M. FOGARTY, P. J. GRIFFIN, Appl. Microbiol., **26**, 185 (1973).
11. I. VASILESCU, *Tehnologia şi aplicaţiile industriale ale enzimelor*, Edit. tehnică, Bucureşti 1963, p. 355.
12. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **30**, 291 (1947).
13. A. R. LAUWERS, *The standardization of proteinases*, în *Enzymes in Clinical Chemistry*, sub red. R. RUYSSEN şi L. VANDENDRIESSCHE, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1965, p. 28.
14. H. D. SCHELL, V. GHEŢIE, Rom. Biochem. Lett, **1**, 104 (1970).
15. H. D. SCHELL, T. BENŢIA, M. A. MATEESCU, Brevet R. S. România nr. 65382/1977.

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A GLICOPROTEINELOR. XVII. DEGRADAREA PEROXIDAZEI

LOUIS KAMEL TADROS, DANIELA ANDREI, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. S-a urmărit modul de degradare cu papaină a unui extract brut peroxidazic după tratarea cu diferite glicozidaze. După îndepărtarea secvenţială a manozei, galactozei sau glucozei şi a N-acetilglucozaminei cu exoglicozidazele respective, s-au caracterizat izoenzimele peroxidazei, înainte şi după tratarea cu papaină.
S-au întrebuinţat metode electroforetice (disc-electroforeza la pH acid şi la pH alcalin) şi imunochimice (Mancini şi imunoelectroforeza cantitativă), prin care s-au evidenţiat atît activitatea enzimatică, cît şi calitatea de proteină. Concomitent s-a determinat activitatea şi prin metoda cronometrică.
Întregul complex peroxidazic este hidrolizat de către papaină, cu excepţia probelor din care s-a îndepărtat restul de glucoză sau galactoză, care devin rezistente la proteoliză, prin menţinerea activităţilor cumulate ale izoenzimelor B şi C.
Hidroliza cu papaină evidenţiază rezistenţa la proteoliză a izoenzimei B şi scindarea în fragmente antigenice inactive enzimatic a izoenzimei C.

Peroxidaza este una din enzimele de natură glicoproteică a cărei compoziţie în aminoacizi şi glucide este bine stabilită (1). De asemenea se ştie că această enzimă este compusă din şapte izoenzime, fiecare din ele cu structura sa proprie, proteică şi glucidică (1). Ele se împart în trei clase : 1) A, cu trei fracţiuni : A_1, A_2, A_3, care sînt proteine acide, cu aceeaşi parte glucidică : 2) B şi C, proteine bazice, cu aceeaşi parte glucidică ; 3) D şi E, proteine de asemenea bazice, cu aceeaşi parte glucidică. Partea glucidică este total diferită la cele trei clase de izoenzime ; la fel partea proteică, fiind din ce în ce mai bazică de la izoenzima A la E (1).

În aceste condiţii, peroxidaza devine un model ideal de studiu al implicării părţii glucidice în modul de degradare a glicoproteinelor. Prin variaţia compoziţiei sale în aminoacizi cu puncte izoelectrice total diferite pentru fiecare clasă de izoenzime, peroxidaza devine extrem de interesantă în studiul modului de degradare a proteinelor, mai ales în lumina cercetărilor care indică bazicitatea proteinelor ca unul dintre factorii care declanşează endocitoza şi degradarea rapidă intracelulară a proteinelor (2), (3), (4), (5).

Întrebuinţarea *in vitro* a enzimelor proteolitice exocelulare ca model al degradării intracelulare este o cale mai simplă de abordare a cunoaşterii acesteia, cu atît mai mult cu cît întrebuinţarea proteolizei limitate *in vitro* a luat o amploare din ce în ce mai mare în ultimul timp atît pentru studiul structurii cît şi al activităţii unei serii de enzime (6), (7), (8), (9).

Cuplarea acţiunii secvenţiale a exoglicozidazelor cu cea a papainei, enzimă cu pH de acţiune apropiat de cel al glicozidazelor, a fost întrebuinţată de noi ca model pentru studiul implicării resturilor glucidice şi a structurii proteice în modul de degradare a peroxidazei.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit :

— extract brut peroxidazic, obţinut din rădăcini de *Armoracia rusticana*,

— enzime glicozidazice izolate din cotiledoane de *Phaseolus vulgaris* var. *great-northern* : 1) α-manozidază, 2) β-galactozidază, 3) β-glucozidază, 4) N-acetilglucozaminidază ;

— papaină — 2 × cryst. from papaia — Schuchardt München ;

— antiser antiperoxidazic, obţinut de noi prin imunizarea animalelor de laborator.

Obţinerea extractului brut peroxidazic. Obţinerea extractului brut peroxidazic s-a făcut după metoda indicată de L. Shannon şi colab. (1) din rădăcini de hrean (*Armoracia rusticana*) ; 500 g rădăcini de hrean au fost date prin răzătoare şi omogenizate cu 500 ml soluţie $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$ 0,1 M, timp de 2 min. Volumul extractului după omogenizare şi filtrare a fost de 550 ml.

Extractul astfel obţinut a fost în continuare precipitat cu $(NH_4)_2SO_4$ în proporţie de 35% (114,95 g). Precipitarea s-a făcut sub agitare continuă şi s-a lăsat 48 de ore la 4°C.

Volumul supernatantului obţinut prin centrifugare la 5 000 rot/min, timp de 75 min, a fost de 630 ml.

După reprecipitarea cu sulfat de amoniu în proporţie de 90% (295 g) în aceleaşi condiţii şi centrifugare la 5 000 rot/min, timp de 2 ore precipitatul a fost redizolvat în tampon Tris 0,05 M, pH 8,0 + 0,1 M HCl.

Supernatantul obţinut în urma centrifugării la 16 000 rot/min,timp de 2 ore, a fost dializat faţă de tampon acetat 0,005 M, pH 4,4.

Concentraţia proteică a dializatului, calculată după metoda Lowry, a fost de 5,12 mg/ml. Volumul total al dializatului a fost de 60 ml.

Determinarea activităţii extractului peroxidazic. Preparatul enzimatic a demonstrat activitate peroxidazică, detectată după metoda lui I. Brad şi colab. (10) ; 0,2 ml amestec peroxidazic diluat (0,8%) a fost adăugat peste 2 ml benzidină + acid ascorbic 0,1% şi 1 ml H_2O_2 4%. Timpul obţinut pînă la apariţia culorii albastre a fost de 12 secunde.

Activitatea enzimatică, exprimată în μmoli acid ascorbic oxidaţi/min, s-a calculat după formula :

$$\frac{5{,}6 \times 60\ s}{t} \times f,$$

unde

t = timpul în secunde pînă la apariţia culorii albastre, f = factorul de diluţie al enzimei, 5,6 = = 5,6 μmoli în 0,1% acid ascorbic.

Rezultatul obţinut a fost de 1750 μmoli/min. Extractul brut peroxidazic a fost păstrat la 0°C şi folosit în experienţele ulterioare în diluţie de 1 : 5 (1024 μg/ml).

Obţinerea enzimelor glicozidazice din *Phaseolus vulgaris*. Enzimele α-manozidază, β-galactozidază, β-glucozidază şi N-acetilglucozaminidază au fost izolate din cotiledoane de fasole (*Phaseolus vulgaris* var. *great-northern*) după metoda indicată de K. Agrawal şi O. Bahl (11). Cotiledoanele de fasole necesare au fost obţinute prin germinarea a 900 g fasole la 28°C şi la întuneric.

Cele 1 250 g cotiledoane obţinute după îndepărtarea germenilor au fost omogenizate cu 1 920 ml tampon citrat 0,2 M, pH 6, de trei ori.

După o oră de repaus, omogenatul a fost centrifugat la 5 000 rot/min, timp de o oră, obţinîndu-se 1 l supernatant. Extractul astfel obţinut a fost precipitat în proporţie de 65% cu sulfat de amoniu (430 g). Precipitatul rezultat după centrifugare la 25 000 rot/min, timp de 2 ore a fost dizolvat în 300 ml tampon citrat 0,2 M, pH 6.

După reprecipitarea cu sulfat de amoniu în proporţie de 65% (129 g) şi centrifugare 2 ore la 2 500 rot/min, precipitatul final a fost dizolvat în 250 ml tampon citrat 0,05 M, pH 4,6 şi lăsat pentru 3 ore la rece (4°C).

După centrifugare la 2 500 rot/min, timp de 2 ore, supernatantul ce conţine amestecul enzimatic a fost precipitat 100% cu sulfat de amoniu (191,75 g).

Reluarea precipitatului s-a făcut în 180 ml tampon citrat 0,05 M, pH 4,6, obţinîndu-se preparatul necesar pentru separarea diferitelor glicozidaze.

Separarea s-a făcut prin cromatografie pe DEAE-Sephadex A_{50}, echilibrată cu tampon fosfat 0,04, pH 6,5. Coloana a avut dimensiunile de 21/2,5 cm și a fost încărcată cu 24 ml (140 mg proteină).

Eluția s-a făcut continuu cu gradient de concentrație: tampon fosfat 0,04 M, pH 7,5 și soluție NaCl 1 M în tampon fosfat. Viteza de eluție a fost de 45 ml/oră. Colectarea fracțiunilor s-a efectuat în probe de cîte 2 ml/eprubetă. În urma citirii concentrației proteice s-a trasat curba de eluție, prezentată în figura 1.

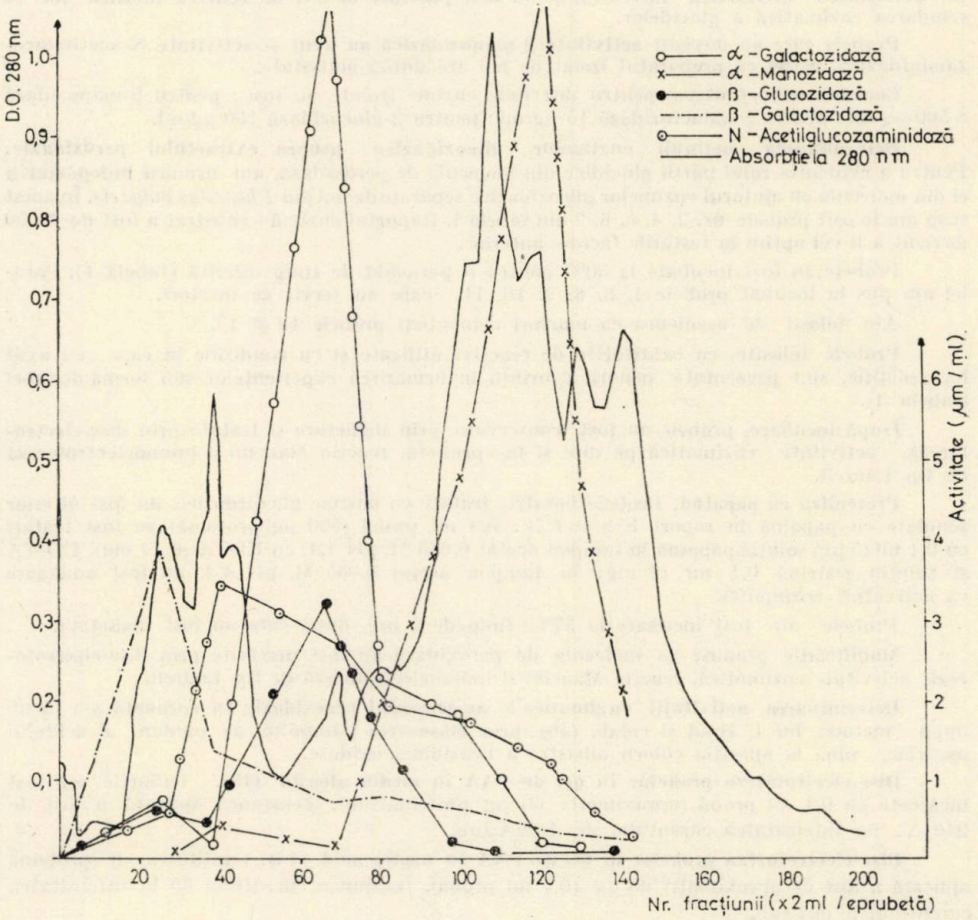


Fig. 1. — Graficul cromatografiei pe DEAE—Sephadex A_{50} pentru separarea enzimelor glicozidazice din *Phaseolus vulgaris*.

Determinările de activitate enzimatică pentru fracțiunile separate cromatografic în vederea izolării enzimelor glicozidazice s-au făcut spectrofotometric după metoda lui Findally și colab. (12).

Substraturile folosite au fost:

1) soluție 25 mM P-nitrofenil-α-D-manopiranozid în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 4,0 pentru α-manozidază;

2) soluție 25 mM P-nitrofenil-2-acetamid 2-deoxi-β-D-acetilglucozaminidază în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 4,6 pentru β-D-acetilglucozaminidază;

3) soluție 25 mM P-nitrofenil-β-D-glucopiranozid în tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH 5,0 pentru β-glucozidază;

4) soluţie 25 mM P-nitrofenil-β-D-galactopiranozid în tampon citrat-fosfat 0,05 M,, pH 6,6 pentru β-D-galactozidază.

100 µl substrat au fost incubaţi cu 350 µl tampon citrat-fosfat 0,05 M, pH corespunzător, pentru 10 min, la 30°C. După adăugarea a 50 µl din amestecul enzimatic, probele au fost incubate la 30°C, timp de 10 min. Reacţia a fost stopată prin adăugarea a 650 µl de Na_2CO_3, 0,2 M. Intensitatea culorii galbene a fost imediat măsurată la 420 nm.

În urma determinărilor făcute s-au separat diferitele fracţiuni enzimatice, în funcţie de activitatea enzimatică dovedită, şi au fost păstrate la 0°C în vederea folosirii lor la scindarea enzimatică a glucidelor.

Probele care au dovedit activitate β-manozidazică au avut şi activitate N-acetilglucozaminidazică, astfel că preparatul izolat de noi are dublă activitate.

Concentraţiile proteice pentru diferitele enzime izolate au fost: pentru β-manozidază 8 500 µg/ml; pentru β-galactozidază 15 µg/ml; pentru β-glucozidază 150 µg/ml.

Determinarea acţiunii enzimelor glicozidazice asupra extractului peroxidazic. Pentru a evidenţia rolul părţii glucidice din molecula de peroxidază, am urmărit îndepărtarea ei din moleculă cu ajutorul enzimelor glicozidazice separate de noi din *Phaseolus vulgaris*. În acest scop am folosit probele nr. 2, 4, 5, 6, 7 din tabela 1. Raportul enzimă—substrat a fost de 1 : 50 dovedit a fi cel optim în testările făcute anterior.

Probele au fost incubate la 30°C pentru o perioadă de timp diferită (tabela 1). Paralel am pus la incubat probele 1, 3, 8, 9, 10, 11, care au servit ca martori.

Am folosit de asemenea ca martori neincubaţi probele 12 şi 13.

Probele folosite, cu cantităţile de reactivi utilizate şi cu condiţiile în care au avut loc reacţiile, sînt prezentate pentru uşurinţă în urmărirea experienţelor sub formă de tabel (tabela 1).

După incubare, probele au fost conservate prin îngheţare şi testate prin disc-electroforeză, activitate enzimatică pe disc şi în eprubetă, reacţia Mancini şi imunoelectroforeză de tip Laurell.

Proteoliza cu papaină. Probele noastre, tratate cu enzime glicozidazice, au fost ulterior scindate cu papaină în raport E/S = 1/50; 0,8 ml probă (500 µg proteină) au fost tratați cu 0,1 ml (5 µg) soluţie papaină în tampon acetat 0,065 M, pH 4,4, cu EDTA (0,74 mg). ED-TA şi soluţia cisteină 0,1 ml (2 mg) în tampon acetat 0,065 M, pH 4,4, au fost adăugate ca activatori enzimatici.

Probele au fost incubate la 37°C, timp de 5 ore, după care au fost îngheţate.

Modificările produse în molecula de peroxidază au fost urmărite prin disc-electroforeză, activitate enzimatică, reacţia Mancini şi imunoelectroforeză de tip Laurell.

Determinarea activităţii enzimatice a amestecului peroxidazic în eprubetă s-a făcut după metoda lui I. Brad şi colab. (10), prin măsurarea timpului de oxidare al acidului ascorbic, pînă la apariţia culorii albastre a benzidinei oxidate.

Disc-electroforeza probelor în gel de PAA în mediu alcalin (13). Tuburile au fost încărcate cu 0,1 ml probă (aproximativ 60 µg proteină/tub). Tensiunea aplicată a fost de 240 V, iar intensitatea curentului de 1 mA/tub.

Disc-electroforeza probelor în gel de PAA în mediu acid (14). Cantitatea de proteină aplicată a fost de aproximativ 60 µg (0,1 ml probă), tensiunea curentului 60 V, intensitatea curentului 3 mA/tub.

Determinarea activităţii enzimatice pe disc s-a făcut după indicaţiile lui L. Shannon şi colab. (1) pentru peroxidază.

Gelurile au fost imersate pentru 5 min într-un amestec benzidină 40 ml + 0,5 ml H_2O_2 1,5%.

Culoarea albastră a benzilor se schimbă cu timpul în maron. După colorare, gelurile se pun în apă distilată.

Reacţia Mancini s-a făcut în gel de agaroză 1% (15). Raportul antiser-gel a fost de 1 : 20. Colorarea s-a făcut cu amidoschwartz timp de o oră.

Imunoelectroforeza de tip Laurell (16) s-a făcut în gel de agaroză 1%. Raportul antiserului în gel de 1 : 20. Tensiunea curentului aplicată a fost de 140 V, iar intensitatea de 16 mA. Colorarea s-a făcut cu amidoschwartz, o oră (16) pentru proteine şi după indicaţiile lui Shannon (1) pentru activitate.

REZULTATE

Ca substrat am întrebuințat extractul brut de peroxidază, care conține toate cele șapte izoenzime (A_1, A_2, A_3, B, C, D și E) a căror prezență a fost semnalată de Shannon și colab. (1).

Exoglicozidazele întrebuințate, precum și modul lor de administrare sînt date în tabela 1.

Activitatea enzimatică a probelor tratate cu exoglicozidaze. Rezultatele sînt prezentate în tabelele 2 și 3 și în figura 2, *a*.

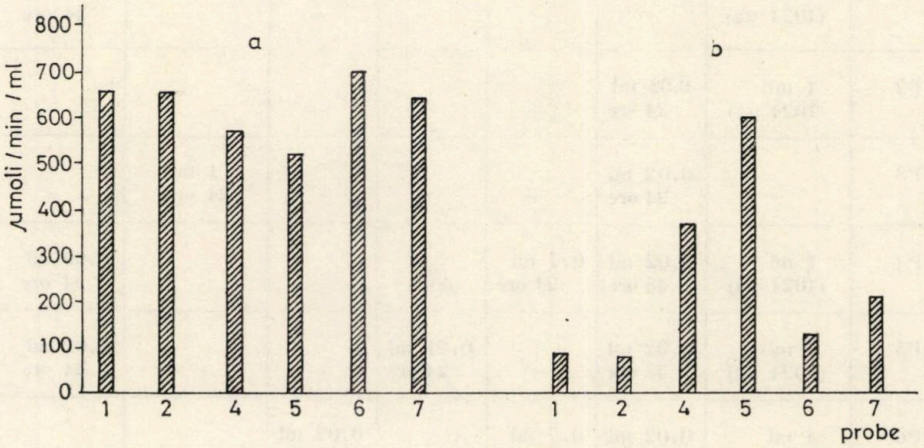


Fig. 2. — Diagrama activităților peroxidazice : a) după tratarea cu enzime glicozidazice ; b) după tratarea cu enzime glicozidazice și papaină (vezi tabela 1).

S-a constatat că nici una din enzimele glicozidazice întrebuințate nu are activitate peroxidazică (probele 3, 8, 9, 10 și 11). A trebuit să facem aceste probe martor deoarece sursa exoglicozidazelor conține de asemenea parțial peroxidază.

În afara martorului 1 (peroxidază incubată), am mai practicat doi martori de peroxidază (neincubați), probele 12 și 13, în două tampoane diferite, unul în tampon acetat (proba 12), care este tamponul de elecție al peroxidazei, și unul în tampon citrat (proba 13), tamponul de acțiune al glicozidazelor, prezent în toate celelalte probe.

Incubarea (proba 1) și tratarea cu tampon citrat (proba 13) scad activitatea peroxidazei cu 13%, activitate pe care am luat-o drept martor.

Tratarea cu α-manozidază (proba 2) nu a produs nici o modificare a activității enzimatice față de martorul incubat (proba 1) și față de martorul în tampon citrat (proba 13).

Tratarea succesivă a peroxidazei cu α-manozidază și β-galactozidază (proba 4) a condus la o scădere a activității enzimatice cu 12% față de martorul incubat (proba 1). Tratarea succesivă a peroxidazei cu α-manozidază și β-glucozidază a condus la o scădere și mai accentuată a activității, cu 22%.

Tabela

Condiţiile de experimentare pentru

PROBA NR.	EXTRACT BRUT PEROXIDAZIC DILUAT 1 :5 (1024 μg/ml)	INCUBARE LA 30°C					
		α-manozidază	β-galactozidază	β-glucozidază	N-acetil-glucozaminidază	tampon acetat 0.05M, pH 4,4	tampon citrat 0.05M, pH 4,0
P1	1 ml (1024 μg)	—	—	—	—	—	0,02 ml 24 ore
P2	1 ml) (1024 μg)	0,02 ml 24 ore	—	—	—	—	—
P3	—	0,02 ml 24 ore	—	—	—	1 ml 24 ore	—
P4	1 ml (1024 μg)	0,02 ml 48 ore	0,7 ml 24 ore	—	—	—	0,02 ml 24 ore
P5	1 ml) (1024 μg)	0,02 ml 48 ore	—	0,21 ml 24 ore	—	—	0,02 ml 24 ore
P6	1 ml (1024 μg)	0,02 ml 72 ore	0,7 ml 48 ore	—	0,02 ml 24 ore	—	—
P7	1 ml (1024 μg)	0,02 ml 72 ore	—	0,21 ml 48 ore	0,02 ml 24 ore	—	—
P8	—	—	0,7 ml 48 ore	—	—	1 ml 48 ore	0,02 ml 24 ore
P9	—	—	—	0,21 ml 48 ore	—	1 ml 48 ore	0,02 ml 24 ore
P10	—	0,02 ml 72 ore	—	—	—	1 ml 72 ore	0,7ml— —48 ore 0,02ml — —24 ore
P11	—	0,02 ml 72 ore	—	—	—	1 ml 72 ore	0,21 ml— —48 ore 0,02 ml— —24 ore
P12	1 ml (1024 μg)	—	—	—	—	0,74 ml neincubat	—
P13	1 ml (1024 μg)	—	—	—	—	—	—

1

probele conținînd extract brut peroxidazic

TAMPON CITRAT 0,05M pH 4,0	INCUBARE LA 37°C, 5 ore raport E:S = 1/100			CONSERVARE PRIN
	ml probă	papainăcu EDTA	cisteină	
0,72 ml	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
0,72 ml	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5 μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
0,72 ml	—	—	—	înghețare
—	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5 μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
0,49 ml	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5 μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
—	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5 μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
0,49 ml	—	—	—	
	0,8 ml	0,1 ml (5 μg)	0,1 ml (2 mg)	înghețare
0,035 ml	—	—	—	înghețare
0,525 ml	—	—	—	înghețare
—	—	—	—	înghețare
—	—	—	—	înghețare
—	—	—	—	înghețare
0,74 ml	—	—	—	înghețare

Adăugarea N-acetilglucozaminidazei după α-manozidază şi β-galactozidază sau, respectiv, β-glucozidază (probele 6 şi 7) a condus la o creştere a activităţii peroxidazei cu 1% la proba 6 şi la o scădere cu 2% la proba 7, aceste variaţii mici denotînd de fapt o menţinere practic neschimbată a activităţii peroxidazei.

Tabela 2

Activitatea enzimatică a probelor tratate cu enzime glicozidazice

Proba nr.	Timpul (secunde)	Activitatea enzimatică, în μ moli/min, a probelor de 1 ml extract brut diluat 1 : 5	Activitatea enzimatică, în μ moli/min, a extractului peroxidazic brut
1	45	129,98	649,9
2	45	129,98	649,9
3	0	—	—
4	51	114,66	573,3
5	58	100,75	503,8
6	42	139,2	696
7	46	127,02	635,1
8	0	—	—
9	0	—	—
10	0	—	—
11	0	—	—
12	39	149,8	749
13	45	129,98	649,9

Tabela 3

Exprimarea procentuală a modificărilor de activitate enzimatică a extractului peroxidazic după tratarea cu enzime glicozidazice

Proba nr.	Activitate enzimatică	Martor de 100 %	Activitate pierdută la %	Martor de 100 %	Activitate cîştigată la %
1	129,98	149,80	13	—	—
2	129,98	129,98	0	—	—
3	—	—	—	—	—
4	114,66	129,98	12	—	—
5	100,75	129,98	22	—	—
6	139,2	129,98	+1	114,66	+21
7	127,02	129,02	2	100,75	+26
8	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—
12	149,80	149,80	0	—	—
13	129,98	149,98	13	—	—

Dacă s-au luat martori, proba tratată cu β-galactozidază (proba 4) şi proba tratată cu β-glucozidază (proba 5), atunci activitatea peroxidazei la probele 6 şi 7 a manifestat o creştere de 21% şi, respectiv, de 26%. Ultimele date indică modificări ale activităţii peroxidazei prin prezenţa sau absenţa unor resturi glucidice terminale.

Tratarea cu papaină a probelor tratate anterior cu exoglicozidaze (tabelele 4 și 5 și fig. 2, *b*).

Tabela 4

Activitatea enzimatică a probelor după tratarea cu papaină

Proba nr.	Timpul (secunde)	Activitatea enzimatică, în μmoli/min, a probelor de 1 ml extract brut diluat 1: 5	Activitatea enzimatică, în μ moli/min, a extractului peroxidazic brut
1	42	17,4	87
2	50	14,61	73,05
4	10	73,04	365,2
5	58	116,3	581
6	29	25,22	126
7	18	40,65	203,25
12	60	12,17	60,85

Tabela 5

Exprimarea procentuală a modificărilor de activitate enzimatică după proteoliza cu papaină a extractului peroxidazic tratat cu enzime glicozidazice, comparativ cu probele tratate cu enzime glicozidazice

Proba nr.	Activitate enzimatică	Martor de 100 %	Activitate pierdută la %	Martor de 100 %	Activitate pierdută la %	Martor de 100 %	Activitate pierdută la %
1	17 40	149 80	88	—	—	129 98	87
2	14 61	129,98	89	—	—	129,98	89
4	73,04	129,98	44	—	—	114,66	36
5	116,30	129,98	11	—	—	100,75	+15
6	25,22	129,98	81	73,04	65	139,20	82
7	40,65	129,98	69	116,30	65	127,02	68
12	12,17	149,80	92	—	—	149,80	92

S-a constatat o scădere marcată a activității enzimatice a peroxidazelor, scădere diferită, dependent de restul glucidic rămas ca ultim pe lanțul complex glucidic. Martorul neincubat (proba (12), care acționează în tamponul său de elecție, tampon acetat, și-a scăzut cel mai mult activitatea, cu 92%, față de același martor fără papaină. O comportare similară a prezentat și enzima tratată cu α-manozidază. Îndepărtarea ulterioară a restului galactozic (proba 4) a condus la rezistența acesteia la acțiunea proteolitică, proba prezentînd o scădere de 44% a activității, iar îndepărtarea restului glucozic (proba 5) la o rezistență foarte crescută la acțiunea papainei, cu o scădere de numai 11% a activității.

Am presupus implicarea restului N-acetilglucozaminic rămas terminal la ambele probe (4 și 5) în rezistența la proteoliză. Eliminarea lui (probele 6 și 7) a mărit susceptibilitatea la proteoliză, dar diferențiat: după β-galactozidază activitatea a scăzut cu 81%, iar după β-glucozidază cu 69%. Dacă am luat însă ca referință activitățile de la proba 4 (îndepăr-

tarea galactozei) şi de la proba 5 (îndepărtarea glucozei) pentru probele 6 şi, respectiv 7, am constatat o scădere practic egală între ele, de 65%. Însă raportarea la activităţile deţinute numai după acţiunea enzimelor glicozidazice (tabela 2) a condus la cu totul alte date : incubarea şi tratarea cu β-manozidază la cea mai mare pierdere de activitate (probele 1 şi 2), tratarea cu β-galactozidază şi β-glucozidază la o scădere doar cu 36% şi, respectiv, la o creştere cu 15%.

Îndepărtarea glucozei pune în evidenţă un rest glucidic care îi conferă nu numai rezistenţă la proteoliză, ci şi o creştere a activităţii.

Îndepărtarea ulterioară a restului N-acetilglucozaminic a condus la pierderi de activitate de 82% în cazul β-galactozidazei şi de 68% în cazul β-glucozidazei.

Activitatea enzimatică evidenţiată după disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă (PAA) la pH alcalin este dată de izoenzimele care migrează spre anod (A_1, A_2, şi A_3) (fig. 3).

Activităţile s-au evidenţiat în fracţiuni cu viteze mari de migrare, separîndu-se în două fracţiuni evidente şi în una foarte slabă. Vitezele lor de migrare corespund cu cele indicate de Shannon şi colab. (1). După tratarea cu β-galactozidază sau β-glucozidază apare clar încă o fracţiune de activitate, fracţiune care după teza de migrare nu este A_3, deoarece în acest caz ar fi trebuit să fie mult mai apropiată de fracţiunea A_2 (1). Această fracţiune nu este totuşi datorată nici preparatelor de β-galactozidază sau β-glucozidază deoarece acestea, migrate în condiţii şi cantităţi identice cu cele din probele 4, 5, 6 şi 7, nu prezintă activitate (exemplu proba 9).

Un fapt inexplicabil este activitatea mai slabă a probelor 6 şi 7 faţă de activitatea lor mare obţinută prin metoda cronometrică (fig. 2).

În prezenţa papainei (fig. 4), în contextul migrării extractului brut, izoenzimele de tip A nu sînt hidrolizate, observîndu-se chiar o creştere a activităţii enzimatice. Fracţiunea evidenţiată după tratarea cu unele glicozidaze se menţine şi după tratarea cu papaină.

Activitatea enzimatică evidenţiată după disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă (PAA) la pH acid este dată de izoenzimele care migrează spre catod (B, C, D şi E) (fig. 5). Activităţile se concentrează în două grupe de cîte două fracţiuni, cu mobilităţi întrutotul asemănătoare celor prezentate de Shannon şi colab. (1), fiind deci respectiv izoenzimele B, C, D şi E, în ordinea încărcării lor pozitive.

Tratarea cu α-manozidază, care cuprinde şi N-acetilglucozaminidază, scade uniform activitatea tuturor izoenzimelor bazice (probele 2, 6 şi 7).

După tratarea cu papaină (fig. 6), dispare banda de activitate a izoenzimei C şi rămîne constant activitatea izoenzimei B.

Izoenzimele D şi E, după tratare cu glicozidaze, formează o singură bandă, mai difuză, prezentă la toate probele. La probele tratate cu glicozidaze, în afară de proba 5, mai apare o bandă difuză de activitate cu viteză mare de migrare, care probabil provine din izoenzima C.

Antigenicitatea extractului brut peroxidazic urmărită prin metoda Mancini. Modificările suferite de peroxidază în calitatea ei de proteină-antigen s-au urmărit prin metoda Mancini (fig. 7 şi 8). Nu s-au evidenţiat decît două inele de precipitare, care prin migrarea lor catodică (vezi fig. 9)

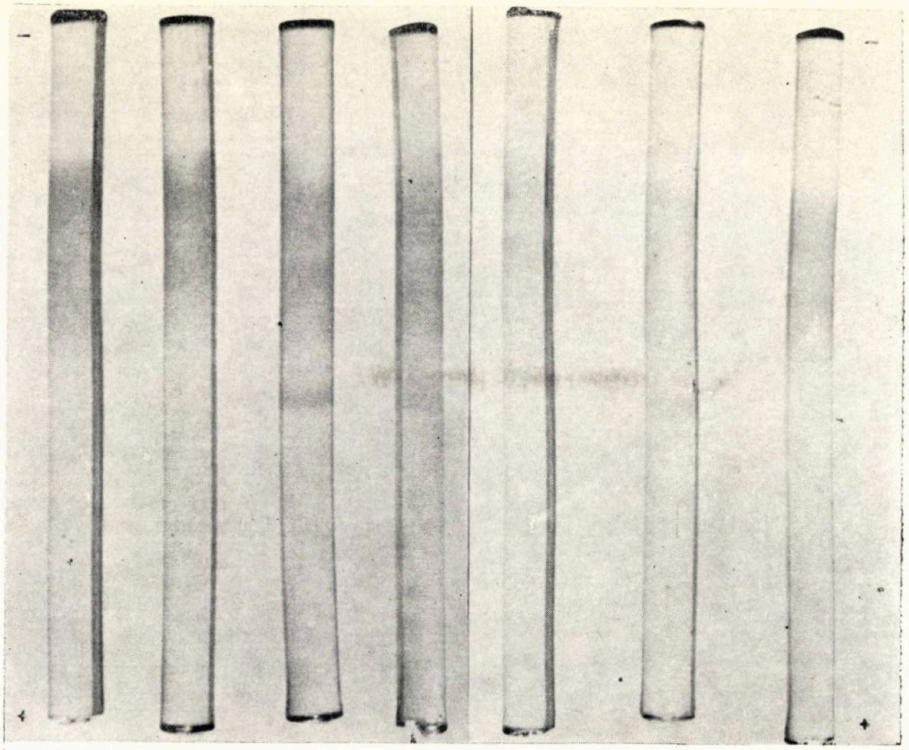


Fig. 3. — Disc-electroforeza în gel de PAA, pH alcalin, a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice. Colorație pentru activitate (vezi tabela 1).

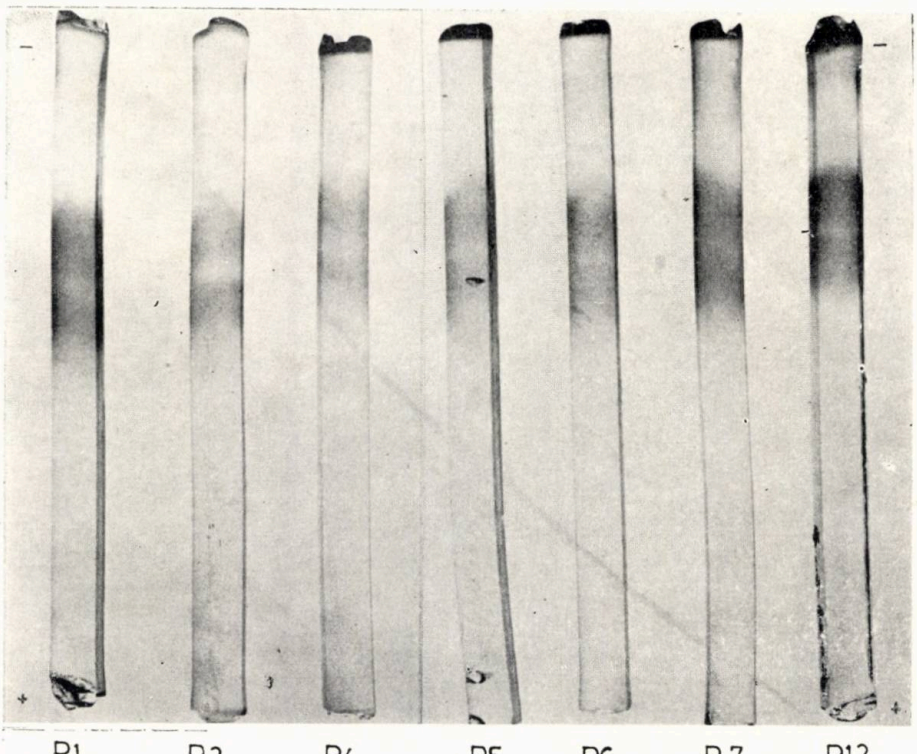


Fig. 4. — Disc-electroforeza în gel de PAA, pH alcalin, a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice și papaină. Colorație pentru activitate (vezi tabela 1).

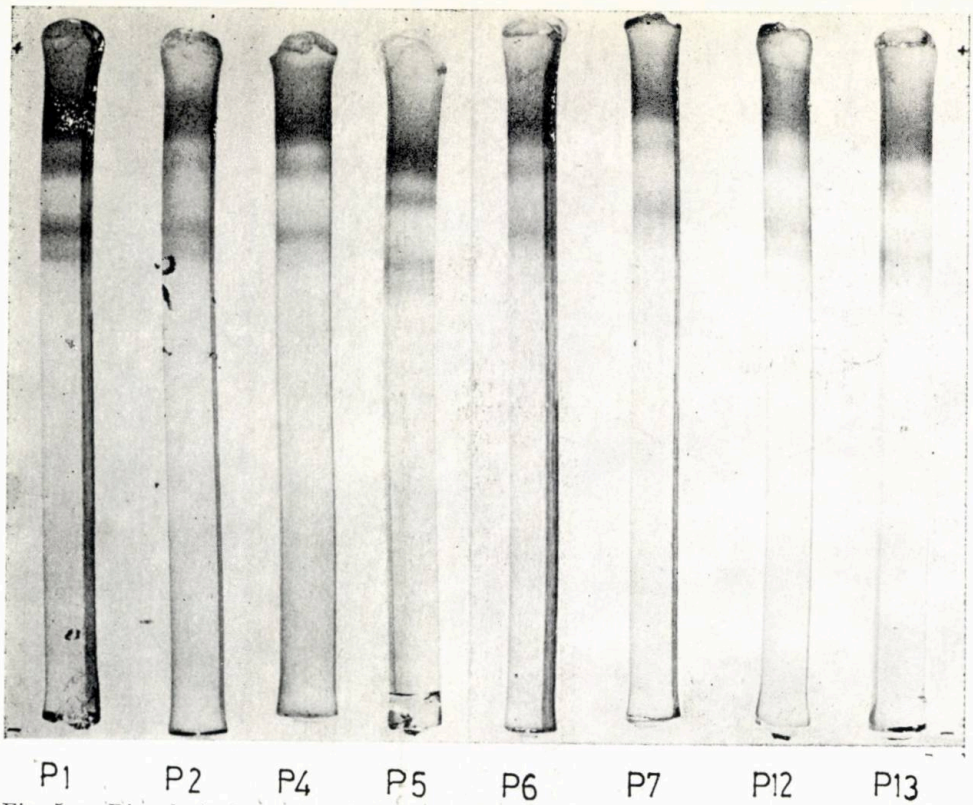


Fig. 5. — Disc-electroforeza în gel de PAA, pH acid, a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice. Colorație pentru activitate (vezi tabela 1).

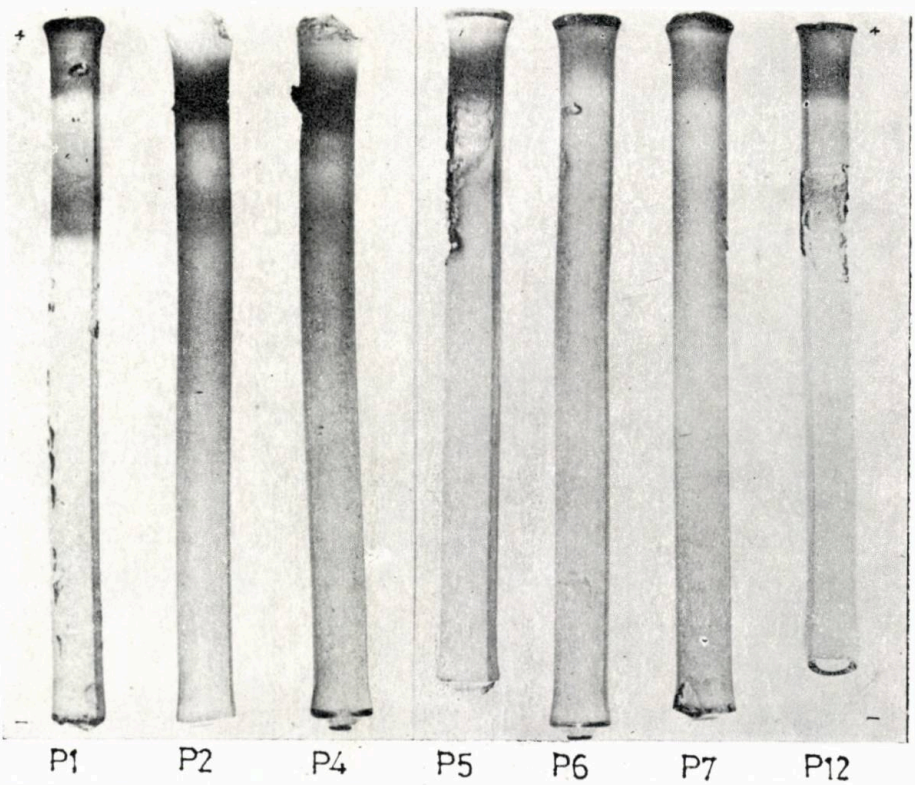


Fig. 6. — Disc-electroforeza în gel de PAA, pH acid, a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice și papainã. Colorație pentru activitate (vezi tabela 1).

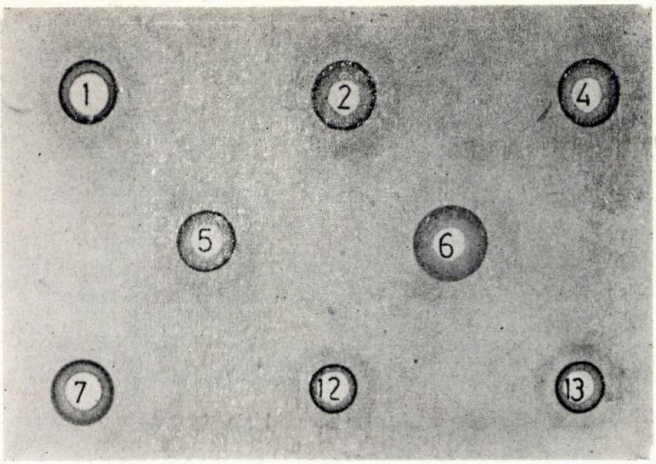


Fig. 7. — Imunodifuzia probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice, în gel de agaroză 1%, conţinînd ser antiperoxidazic în raport 1 : 20.

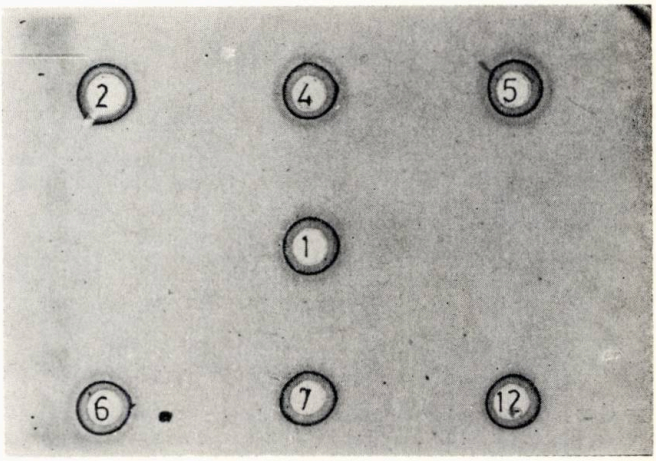


Fig. 8. — Imunodifuzia probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice şi papaină, în gel de agaroză 1%, conţinînd antiser antiperoxidazic în raport 1 : 20.

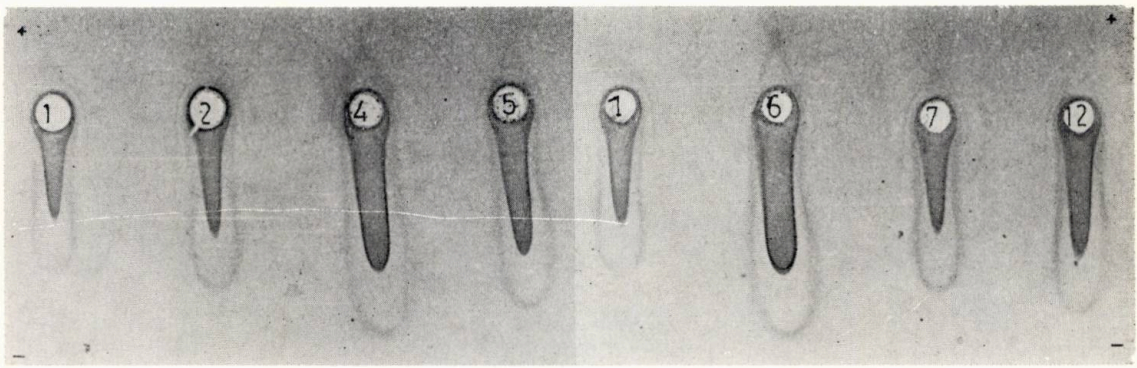


Fig. 9. — Imunoelectroforeza de tip Laurell a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice, în gel de agaroză 1% cu antiser antiperoxidazic în raport 1 : 20. Coloraţie pentru proteină.

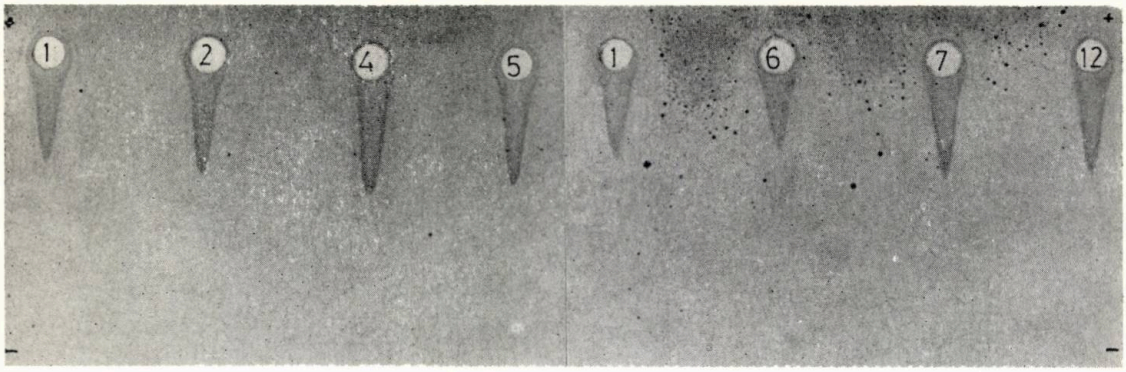


Fig. 10. — Imunoelectroforeza de tip Laurell a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice și papainã, în gel de agaroză 1 % cu antiser antiperoxidazic în raport 1 : 20. Colorație pentru proteină.

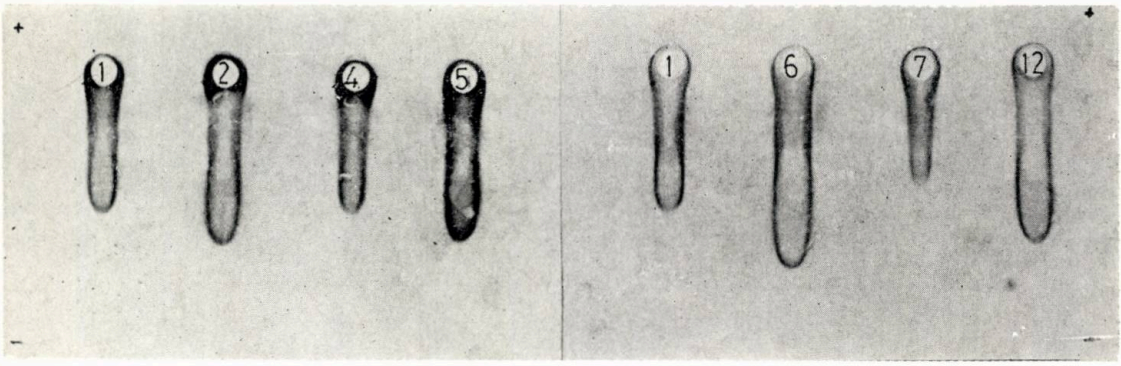


Fig. 11. — Imunoelectroforeza de tip Laurell a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice, în gel de agaroză 1 % cu antiser antiperoxidazic în raport 1 : 20. Colorație pentru activitate.

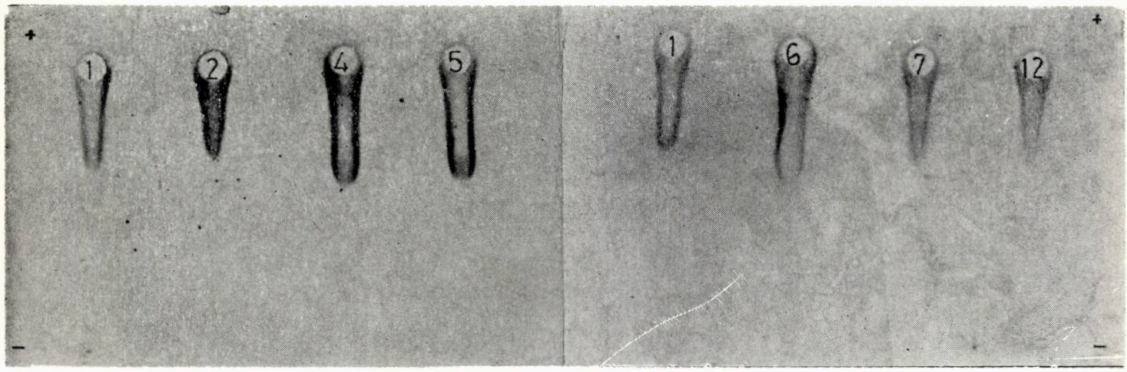


Fig. 12. — Imunoelectroforeza de tip Laurell a probelor de extract brut peroxidazic tratate cu enzime glicozidazice și papainã, în gel de agaroză 1 % cu antiser antiperoxidazic în raport 1 :20. Colorație pentru activitate.

s-au dovedit a fi izoenzimele B și C. Probele de peroxidază neincubate (12 și 13) au avut diametre de difuzie mult mai mici decît proba incubată (1), ceea ce denotă o modificare conformațională a protein-enzimei prin incubare, care a condus la o pierdere de activitate de 13% (tabela 2). Modificări conformaționale evidențiate prin mărirea vitezei de difuzie în gel s-au obținut și la probele tratate cu glicozidaze. Se remarcă în mod deosebit proba 6 (tratarea succesivă cu α-manozidază, β-galactozidază și N-acetilglucozaminidază) prin difuzie mare a ambelor izoenzime. Dar tocmai această probă a avut activitatea cea mai mare (tabela 2), invers decît la proba martor, unde modificările conformaționale au dus la reducerea activității.

Tratarea cu papaină (fig. 8) a probelor a condus la micșorarea vitezei de difuzie a ambelor izoenzime, datorată probabil unei interacțiuni între partea glucidică a componentelor din probe și gelul de agaroză.

În plus, inelul de precipitare al izoenzimei C (cu viteza de difuzie mai mare) a dispărut la probele martor, ca și la probele 2 și 7, menținîndu-se la probele 4, 5 și 6, care și-au păstrat cea mai mare parte din activitate după hidroliza cu papaină (tabela 4).

Antigenicitatea izoenzimelor peroxidazice urmărită prin metoda imunoelectroforezei cantitative. Serul imun realizat cu peroxidază totală purificată, Serva, nu a recunoscut decît două proteine cu migrare catodică și una cu migrare slabă anodică (fig. 9). Proteina anodică nu a suferit modificări după tratament cu glicozidaze. Probele tratate cu β-galactozidază (4 și 6) au prezentat o migrare catodică mult mai avansată, care la proba 6 concordă cu difuzia urmărită în gel de la reacția Mancini (fig. 7) și cu activitatea maximă determinată cronometric (tabela 2).

După hidroliza cu papaină (fig. 10), racheta de precipitare a izoenzimei C a dispărut la toate probele, cu excepția tocmai a probelor tratate cu β-galactozidază (4 și 6), dar cu micșorarea vitezei de migrare. Racheta de precipitare a izoenzimei B și-a micșorat viteza de migrare, dar a rămas puternic evidențiată la toate probele.

Rezultatele concordă cu cele de la reacția Mancini (fig. 9).

Colorarea pentru activitate enzimatică a rachetelor de precipitare (fig. 11 și 12) a evidențiat prezența ei numai la fracțiunile catodice.

Compararea distanței de migrare a fiecărei probe de la colorarea pentru proteine (fig. 9) cu cea de la colorarea pentru activitate (fig. 11) a indicat preponderența activității izoenzimei C la majoritatea probelor, inclusiv a martorului; numai la probele 4 și 7 este evidentă doar activitatea izoenzimei B. Această concentrare a activității pe placă numai la izoenzima B la probele 4 și 7 nu poate indica o participare a resturilor glucidice ci mai degrabă o interacțiune între multiplele componente din probe (extract brut peroxidazic și enzime glicozidazice), cu ascunderea centrului activ al izoenzimei C în condițiile de migrare în gelul cu anticorpi.

Tratarea cu papaină a tuturor probelor (fig. 12) a indicat evident păstrarea activității izoenzimei B la toate probele, cu excepția probei 6, unde s-ar părea că a rămas activitatea izoenzimei C.

Aceste rezultate demonstrează prezența concomitentă a activității ambelor izoenzime la probele tratate numai cu glicozidaze (fig. 1), activitatea izoenzimei B fiind cuprinsă, prin viteza ei de migrare mai mică, în activitatea prezentată de izoenzima C.

Pentru o mai clară prezentare a modificărilor evidenţiate prin imunoelectroforeză cantitativă, rezultatele sînt cumulate în tabela 6.

A reieşit că hidroliza cu papaină a condus la evidenţierea susceptibilităţii la proteoliză a izoenzimei C, a cărei prezenţă ca proteină la probele 4, 5, 6 (fig. 12) nu este confirmată decît la proba 6 (fig. 12), la probele 4 şi 5

Tabela 6

Compararea aspectelor proteice cu activităţile enzimatice, determinate prin imunoelectroforeză cantitativă

Proba nr.	Proteină		Activitate	
	tratare cu glicozidaze	tratare cu glicozidaze şi papaină	tratare cu glicozidaze	tratare cu glicozidaze şi papaină
1	B+C	B	C	B
2	B+C	B	C	B
4	B+C	B+C	B	B
5	B+C	B+C	C	B
6	B+C	B+C	C	C
7	B+C	B	B	B
12	B+C	B	C	B

viteza de migrare mult mai mică fiind probabil a unui fragment inactiv al acestei izoenzime. Intervenţia succesivă a trei glicozidaze, α-manozidază, β-galactozidază şi N-acetilglucozaminidază, la proba 6 a conferit rezistenţă la proteoliză izoenzimei C.

Rezultatele obţinute prin ambele metode imunochimice sînt în perfectă concordanţă.

DISCUŢII

De la început trebuie menţionat că preparatul de peroxidază întrebuinţat a fost un extract brut, care conţinea, pe lîngă toate cele şapte izoenzime peroxidazice, şi o serie de alte proteine contaminante.

Serul imun s-a obţinut însă prin injectarea unui preparat peroxidazic purificat, Serva.

Un alt aspect de luat în considerare este influenţa tamponului în care are loc reacţia peroxidazelor, deoarece studiul spectrofotometric a arătat că poziţia şi intensitatea bandei Soret, a fiecărei izoenzime la un pH dat depind de tipul tamponului de reacţie (1). De aceea am întrebuinţat la toate probele acelaşi raport între tamponul acetat şi citrat, primul ca tampon optim al peroxidazelor (1), iar al doilea ca tampon optim al glicozidazelor (11). În felul acesta am obţinut la probele martor incubate 72 de ore o scădere a activităţii de numai 13% faţă de probele neincubate, comparativ cu scăderea de 33% semnalată de Coffey şi de Duve (17) la 72 ore de incubare numai în tampon acetat.

Studiile calitative ale glucidelor au arătat că izoenzima A are cu totul altă compoziție față de izoenzimele B și C (1). Secvența monozaharidelor în lanțurile glucidice ale peroxidazei este încă necunoscută (1).

Prin compararea structurii părții glucidice de la o serie de glicoproteine (18), (19) cu compoziția calitativă a glucidelor de la izoenzimele peroxidazice, am ajuns la concluzia că structura lanțurilor la izoenzima A este de tip „high mannose", cu o repetare ramificată a „miezului" cu conținut în manoză și N-acetilglucozamină, cu adăugarea unor resturi terminale de galactoză.

Structura lanțurilor la izoenzimele B și C trebuie să fie mult mai complexă, fiind prezente, pe lîngă manoză și glucozamină, fucoza, xiloza și alte resturi glucidice (1). Luînd în considerare toate aceste aspecte, am întrebuințat secvența adăugării exoglicozidazelor, prezentată în tabela 1.

Din rezultate (fig. 2, *a*) reiese că partea glucidică nu are implicații în centrul activ al izoenzimelor peroxidazice, scăderile de 10—20% obținute după îndepărtarea galactozei sau glucozei fiind nesemnificative. Neimplicarea glucidelor în activitatea catalitică a peroxidazelor este confirmată și de faptul că complexele cu hem și alte hemproteine, care nu au partea glucidică, posedă totuși activitate peroxidazică (20).

Papaina produce o hidroliză puternică a peroxidazei (fig. 2, *b*). Prezența unei rezistențe la proteoliză tocmai la probele tratate cu β-galactozidază și β-glucozidază nu mai poate fi nesemnificativă, aducînd un argument în favoarea implicării restului N-acetilglucozaminic în această rezistență, rest care și-a spus cuvîntul și la tratarea numai cu glicozidaze. N-acetilglucozamina poate servi deci și ca semnal de recunoaștere pentru procesul de degradare, nu numai ca receptor celular pentru procesul de captare și endocitoză la nivelul țesutului reticuloendotelial (21). Nu este totuși exclusă nici posibilitatea ca cele două enzime glicozidazice, care sînt parțial purificate, să conțină lectine (22), care să interacționeze cu izoenzimele peroxidazei, și să protejeze prin prezența lor centrul activ al acestora blocînd acțiunea papainei.

Evidențierea activității în gel de poliacrilamidă a demonstrat rezistența la proteoliză a izoenzimelor A și B și scindarea izoenzimei C în fragmente antigenice, dar inactive enzimatic. Rezultatele pentru izoenzimele B și C sînt confirmate de studiul imunochimic. Intervenția părții glucidice în procesul de proteoliză este evidentă numai la proba 6 (peroxidaza tratată succesiv cu trei exoglicozidaze), la care raportul galactoză/N-acetilglucozamină este decisiv, conferindu-i o modificare conformațională, caracterizată imun și catalitic prin menținerea activității izoenzimei C. Este curioasă disjuncția de comportare la proteoliză a celor două izoenzime, dacă luăm în considerare structura lor glucidică identică.

În acest caz, devine importantă posibilitatea aranjării acelorași lanțuri glucidice pe structuri proteice diferite sau pe aceleași structuri, dar în situsuri diferite (19), ipoteza susținută și de concluzia că hemul este atașat diferit la izoenzimele peroxidazei (1), (23).

Implicarea specificității părții proteice în procesul de proteoliză este indicată de comportarea total deosebită a celor două izoenzime bazice, B și C, izoenzima B foarte rezistentă, izoenzima C hidrolizabilă ușor în fragmente mari cu pierderea totală a activității.

Aceste rezultate nu confirmă presupunerea că una din bazele chimice cu implicaţii în modul de captare şi scindare a proteinelor la nivel celular este încărcarea lor pozitivă (2), (3), (4), (5), (24). Diferenţele foarte mici de încărcare pozitivă între izoenzimele B şi C nu pot explica comportarea lor diferită la proteoliză.

Reiese că nici partea glucidică şi nici încărcarea pozitivă nu sînt responsabile fiecare în parte de diferenţele nete ale modului de degradare a izoenzimelor bazice B şi C.

Implicarea ambelor este sugerată de ataşarea diferită a hemului al izoenzimele peroxidazice (23).

În ceea ce priveşte izoenzima A, rezultatele nu sînt concludente, avînd în vedere lipsa datelor imunochimice prin absenţa anticorpilor specifici în serul imun.

Modul de scindare a izoenzimei C confirmă încă o dată justeţea întrebuinţării proteolizei limitate ca model al degradării intracelulare a proteinelor (8),(9).

Proteoliza limitată şi întrebuinţarea exoglicozidazelor s-au dovedit a fi metode eficace în stabilirea structurii părţii glucidice şi a modului de degradare a izoenzimelor peroxidazice.

Confirmarea şi aprofundarea rezultatelor impun extinderea cercetărilor cu aceleaşi metodologii pe fiecare izoenzimă purificată.

CONCLUZII

Prin întrebuinţarea unui extract brut peroxidazic care cuprinde toate cele şapte izoenzime, s-a arătat că resturile glucidice nu sînt esenţiale pentru activitatea peroxidazică a întregului complex.

Întregul complex este hidrolizat practic total de către papaină, cu excepţia probelor din care s-a îndepărtat restul de glucoză sau galactoză, care devin rezistente la proteoliză.

Îndepărtarea restului subpenultim N-acetilglucozaminic readuce complexul proteic la aceeaşi sensibilitate la proteoliză ca a probei iniţiale.

Hidroliza cu papaină evidenţiază rezistenţa la proteoliză a izoenzimei B şi scindarea în fragmente antigenice inactive enzimatic a izoenzimei C.

Rezistenţa la proteoliză a probelor tratate cu β-galactozidază sau β-glucozidază se datorează activităţilor cumulate ale izoenzimelor B şi C.

Prezentat la redacţie
la 8 ianuarie 1982

Institutul de ştiinţe biologice
77748 Bucureşti 17, Splaiul Independenţei nr. 296

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF PROTEINS. XVII. THE DEGRADATION OF PEROXIDASE

SUMMARY

The papain degradation of peroxidase in a crude extract after treatment with various glycosidases was studied. Following sequential removal of mannose, galactose or glucose and N-acetylglucosamine with the

appropriate exoglycosidases, the peroxidase isoenzymes were characterized before and after papain treatment. The enzymatic activity and the protein modifications were revealed by electrophoretical (disc-PAA gel electrophoresis at acid and alkaline pH), immunochemical (Mancini and quantitative immunoelectrophoresis) and chronometrical methods.

The whole peroxidasic complex was degraded by papain, excepting the samples where galactose or glucose were removed ; these became resistant to proteolysis due to the activity of both basic isoenzymes B and C left.

The papain hydrolysis pointed out the resistance to proteolysis of isoenzyme B and the cleavage in antigenical but enzymatically inactive fragments of isoenzyme C.

BIBLIOGRAFIE

1. L. SHANNON, E. KAY, J. LEW, J. Biol. Chem., **241**, 2166 (1966).
2. E. D. WACHSMUTH, D. KLINGMÜLLER, J. Reticuloendothel. Soc., **24**, 227 (1978).
3. T. KOOISTRA, A. M. DUURSMA, M. K. BIJSTERBOSCH, J. M. W. BOUMA, M. GRUBER, Biochim. Biophys. Acta, **587**, 299 (1979).
4. T. KOOISTRA, A. M. DUURSMA, J. M. W. BOUMA, M. GRUBER, Biochim. Biophys. Acta, **631**, 439 (1980).
5. M. K. BIJSTERBOSCH, A. M. DUURSMA, J. M. W. BOUMA, M. GRUBER, P. NIEUWENHUIS, Biochem., J., **200**, 115 (1981).
6. D. P. BLOXHAM, L. E. ERICSSON, K. TITANI, K. A. WALSH, H. NEURATH, Biochemistry, **19**, 3979 (1980).
7. G. SACCOMANI, D. W. DAILEY, G. SACHS, J. Biol. Chem., **254**, 2821 (1979).
8. A. D. McCARTHY, P. JOHNSON, K. F. TIPTON, Biochim. J., **199**, 235 (1981).
9. N. C. PRICE, S. MURRAY, E. J. MILNER-WHITE, Biochim. J., **199**, 239 (1981).
10. I. BRAD, GH. OLTEANU, Z. MARCU, St. cerc. biochim., **12**, 323–326 (1969).
11. K. M. AGRAWAL, O. M. BAHL, J. Biol. Chem., **243**, 103 (1968).
12. J. FINDALLY, G. A. LEVVY, C. A. MARSH, Biochim. J., **69**, 467 (1958).
13. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
14. R. A. REISFELD, V. J. LEWIS, D. E. WILLIAMS, Nature, **195**, 281 (1962).
15. C. MANCINI, C. CARBONARA, HJ. F. HEREMANS, Immunochemistry, **2**, 235 (1965).
16. C. E. LAURELL, Anal. Biochem., **15**, 45 (1966).
17. J. W. COFFEY, C. DE DUVE, J. Biol. Chem., **243**, 3261 (1968).
18. R. KORNEELD, S. KORNFELS, Ann. Rev. Biochem., **45**, 217 (1976).
19. C. MOTAȘ, St. cerc. biochim., **23**, 87 (1980).
20. Y. NAKAMURA, M. TOHJO, K. SHIBATA, Arch. Biochem. Biophys., **102**, 144 (1963).
21. R. TORONSENS, P. STAHL, Biochem., J., **194**, 209 (1981).
22. A. K. ALLEN, N. N. DESAI, A. NEUBERGER, Biochem. J., **155**, 127 (1976).
23. E. H. STRICKLAND, E. KAY, L. M. SHANNON, J. HORWITZ, J. Biol. Chem., **243**, 3560 (1968).
24. H. G. RENNKE, Y. PATEL, M. A. VANKATACHALAM, Kidney Int., **13**, 278 (1978).

CONTRIBUŢII LA STUDIUL FRUCTOZANILOR DIN *IRIS PSEUDACORUS* L.

M. TĂMAŞ, ELENA PROTOPOPESCU

Rezumat. Din rizomii speciei *Iris pseudacorus* L. (*Iridaceae*) au fost dozaţi fructozanii (irisina) prin două metode. Prin metoda gravimetrică s-a determinat un conţinut de 14,10%, iar prin metoda spectrocolorimetrică 6,96% fructozani, exprimaţi în fructoză. În urma hidrolizei acide s-a pus în evidenţă, prin CH, numai fructoză; alte glucide sau fructoza liberă lipsesc.

Fructozanii reprezintă polizaharide de rezervă, întîlnite atît la angiospermele monocotiledonate, cît şi la cele dicotiledonate. Ei se pot găsi ca unice substanţe de rezervă sau împreună cu amidonul. Sînt substanţe amorfe sau microcristaline, solubile în apă numai la cald, nu precipită cu acetatul de Pb, sînt nereducătoare, nefermentabile de către drojdii, rezistă la acţiunea amilazei, dar sînt uşor hidrolizate de către acizi (1), (2).

Fructozanii se găsesc ca substanţe de rezervă în organele subterane ale multor *Iridaceae*. Carles (citat de (3)) îi consideră ca substanţe indicatoare de bază în sistematica biochimică a acestei familii. Astfel, după natura hidraţilor de carbon, speciile genului *Iris* se pot grupa în trei unităţi bine definite: specii numai cu amidon (ex. *Iris germanica*), specii cu amidon şi fructozani (ex. *I. sibirica*) şi specii numai cu fructozani (ex. *I. pseudacorus*).

Irisina a fost izolată pentru prima dată de Walbach (1886, citat de (2), apoi de Schlubach (1933, citat (1), (2)) din rizomii de *Iris pseudacorus*. L. Irisina este o pulbere albă, insolubilă în apă la rece. Ultimul autor consideră că ar avea o structură ciclică cu catene laterale şi un grad mic de polimerizare. După Bell (citat de (4)), irisina se aseamănă foarte mult cu triticina din *Agropyron repens* L. şi constă dintr-un lanţ lung de fructoză, în care fiecare unitate poartă ramificaţii formate dintr-o moleculă de fructoză, iar la capăt o moleculă de zaharoză.

În ceea ce priveşte conţinutul de irisină din rizomii speciei *Iris pseudacorus*, Schlubach, Knoop şi Liu (citaţi de (1)) găsesc, prin metoda gravimetrică, o concentraţie de 7—8% raportată la materialul proaspăt şi 4,7 % în materialul uscat, recoltat în luna iunie.

Specia indigenă *I. pseudacorus* L. (stînjenel galben sau stînjenel de baltă) a atras recent atenţia fitochimiştilor datorită efectului favorabil pe care îl prezintă un extract din rizomi asupra cicatrizării ulcerelor varicoase, ceea ce deschide perspective de utilizare în dermatologie (4), (5), (6). Pînă în prezent asupra speciei provenite din România nu au fost efectuate cercetări chimice.

Ne-am propus să determinăm cantitativ fructozanii din rizomi, atît printr-o metodă clasică, gravimetrică, după izolarea irisinei, după care sînt raportate rezultatele din literatură, cît și printr-o metodă spectrocolorimetrică, ce exprimă irisina în fructoză, eliberată după hidroliza fructozanilor.

MATERIAL ȘI METODE

Am utilizat rizomi proveniți din mlaștina de la Mărtinești-Turda (jud. Cluj), recoltați în luna octombrie, decorticați pentru îndepărtarea suberului, tăiați în rondele, uscați la temperatură sub 50°C și măcinați sub formă de pulbere fină.

Pentru izolarea irisinei am aplicat tehnica indicată de Schlubach și colab., (citați de (4)) : 10,0 g pulbere de rizomi se extrage de trei ori cu cîte 100 ml alcool etilic 95° într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent, timp de cîte o oră. Soluția alcoolică filtrată, în care se extrag taninurile, antocianii, leucoantocianii, se îndepărtează. Pulberea de rizomi se usucă, apoi se extrage în același mod cu apă distilată. Soluțiile apoase se reunesc, se păstrează la rece (2—4°C), după care fructozanii se precipită prin adăugarea a două volume de alcool etilic de 95°. Precipitatul se separă prin centrifugare, se spală cu alcool și apoi se usucă pe $CaCl_2$ sicc. Se obține o pulbere amorfă, de culoare alb-roză, care se cîntărește și se raportează procentual la materialul lipsit de umiditate.

A doua metodă utilizează tehnica indicată de Wallenfels (8), și de Fairbridge și colab. (9), bazată pe transformarea ionilor incolori de trifeniltetrazoliu solubili în trifenilformazani insolubili și de culoare roșie, care se redizolvă în isopropanol.

Ca reactivi am utilizat o soluție apoasă 1% de clorură de trifeniltetrazoliu (Merck), proaspăt preparată, soluție apoasă 1 N de NaOH, acid acetic 1,1 N, isopropanol și o soluție apoasă 0,01% de fructoză (Merck).

În patru eprubete gradate de 20 ml, se pipetează 0,25, 0,50, 0,75 și 1,0 ml din soluția de fructoză, se aduce la 3 ml cu apă, se adaugă 1,0 ml soluție de clorură de trifeniltetrazoliu și 2,0 ml soluție NaOH 1 N. După agitare, eprubetele se introduc, exact 3 min, în baia de apă în fierbere. Se răcesc repede sub un curent de apă și se adaugă 2 ml acid acetic 1,1 N. Se transferă soluțiile în baloane cotate de 25 ml, se aduc la semn cu isopropanol și se agită pînă la dizolvarea formazanului roșu. Se citește extincția soluțiilor la un aparat Spekol la 485 nm, în cuve de 1 cm, față de apă distilată, și cu ajutorul valorilor obținute se construiește o curbă de etalonare.

Pentru determinarea fructozei în pulberea de rizomi, se iau 5,0 g și se introduc într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent. Se adaugă 100 ml H_2SO_4 1 N și se supune hidrolizei pe baia de apă în fierbere, timp de 8 ore. După răcire și filtrare, soluția apoasă se neutralizează cu $Ba(OH)_2$, se filtrează și se aduce la 100 ml cu apă. Din aceasta se iau 10 ml și se diluează la 100 ml cu apă. Din această soluție (0,5%) se iau 0,25 și 0,5 ml și se tratează ca mai sus.

Am mai efectuat și dozarea fructozei din irisina izolată pentru a verifica puritatea acesteia. În acest scop, 0,1 g irisină se hidrolizează cu 10 ml H_2SO_4 1 N, la fel ca în cazul pulberii de rizomi. După neutralizare, soluția se aduce la 1 000 ml cu apă. Din aceasta se iau 1,2 și 3 ml și se tratează cu reactivii citați. Cu ajutorul extincției citite și al curbei de etalonare se calculează concentrația fructozei.

Analiza calitativă am efectuat-o prin cromatografie pe hîrtie Whatman nr. 1. Pe linia de start am aplicat extracte apoase 10% din rizomi, 1% din irisină, hidrolizatele din aceste două probe, iar ca substanță etalon am utilizat o soluție apoasă 0,2% de fructoză. Identificarea s-a efectuat după Hais și Macek (10).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin metoda gravimetrică am determinat un conținut de 14,10% fructozani, iar prin metoda spectrocolorimetrică 6,96% fructozani exprimați în fructoză. Irisina izolată conține 23,3% fructoză.

În urma hidrolizei acide, atît pentru rizomi, cît și pentru irisină, pe cromatogramă se obține o singură pată de culoare roșie-vișinie, după

tratarea cu reactivul clorură de trifenil tetrazoliu (10), care are aceeaşi valoare Rf(0,25) cu a fructozei etalon. Aceasta demonstrează că hidraţii de carbon din rizomii de *I. pseudacorus* sînt formaţi exclusiv din fructozani. În cazul extractului apos de rizomi şi al soluţiei de irisină, pe cromatogramă apare, la start, o pată alungită, pe care o considerăm a corespunde irisinei, dar nu se pot pune în evidenţă fructoză liberă şi nici alte glucide, chiar dacă revelarea se efectuează şi cu reactivul anilină-acid ftalic (10).

Faţă de datele citate în literatură în privinţa conţinutului de fructozani, nu putem face o comparaţie, deoarece materialul analizat de noi a fost recoltat în luna octombrie cînd substanţele de rezervă din rizomi se acumulează în concentraţie maximă, iar datele din literatură se referă la materialul recoltat în timpul înfloririi (iunie).

Prin metoda gravimetrică, rezultatele obţinute indică valori mai ridicate pentru fructozani decît cele obţinute prin metoda spectrocolorimetrică. De aceea apreciem că la izolarea irisinei precipită şi alte substanţe care influenţează rezultatul dozării, fapt confirmat şi cu ocazia dozării fructozei din irisina izolată. Aceste rezultate ne determină să considerăm că prin metoda spectrocolorimetrică se obţin rezultate mai precise în determinarea cantitativă a fructozanilor din rizomi.

CONCLUZII

— Am efectuat o determinare cantitativă a fructozanilor din rizomii speciei *Iris pseudacorus* prin două metode, gravimetrică şi spectrocolorimetrică.

— Am pus în evidenţă, prin tehnica cromatografică, fructoza ca singurul produs de hidroliză a hidraţilor de carbon din rizomii speciei.

Prezentat la redacţie
la 16 ianuarie 1981

IMF, Facultatea de farmacie
3400 Cluj-Napoca

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF FRUCTOSANES FROM *IRIS PSEUDACORUS* L.

SUMMARY

The fructosanes (irisine) from *Iris pseudacorus* L. rhizomes were determined gravimetrically and spectrophotometrically. By using the gravimetric method 14.10% fructosanes were determined whereas by the spectrophotometric one only 6.96% fructosanes (in fructose) were found. Following acid hydrolysis only fructose was identified by paper chromatography, the other sugars and free fructose being absent.

BIBLIOGRAFIE

1. W. J. WHELAN, *Starch, glycogen, fructosane and polysaccharide*, în K. PAECH, M. V. TRACEY, *Modern methods of plant analysis*, vol. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, p. 145.

2. C. BODEA, *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I, Edit. Acad. R.P.R., București, 1964, p. 168.
3. R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. II, Birkhäuser Verlag., Basel-Stuttgart, 1963, p. 236.
4. K. PAECH, M. V. TRACEY, *Modern methods of plant analysis*, vol. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, p. 1.
5. ELENA PROTOPOPESCU, *Studiul farmacobotanic al speciei Iris pseudacorus L.*, teză de doctorat, I.M.F. Cluj-Napoca, 1977.
6. A. RADU, ELENA PROTOPOPESCU, M. TĂMAȘ, I. CĂPUȘAN, CORNELIA POP, *Preparate cu acțiune cicatrizantă obținute din Iris pseudacorus*, Lucrările „Primului Simpozion al medicamentului românesc", București, 1978, p. 609.
7. ELENA PROTOPOPESCU, M. TĂMAȘ, CORNELIA POP, I. CĂPUȘAN, A. RADU, Brevet R.S.România nr. 70297/1979.
8. K. WALLENFELS, Naturwissenschaft, **37**, 491 (1950).
9. R. A. FAIRBRIDGE, K. J. WILLIS, R. G. BOOTH, Biochem., J, **49**, 423 (1951).
10. I. M. HAIS, K. MACEK, *Cromatografia pe hîrtie*, traducere din l. cehă, Editura tehnică, București, 1960.

INFLUENŢA UNOR CATIONI ASUPRA DETERMINĂRII PROTEINELOR PRIN METODA LOWRY

M. ZAMFIR

Rezumat. A fost studiat sistematic efectul unor grupe de cationi asupra determinării proteinelor prin metoda Lowry. Proteinele studiate au fost albumina serică bovină, sulfatul de protamină şi cazeinatul de sodiu. Grupele de cationi, studiate au fost: cationi uşori (Be^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}), cationi din seria p (Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, CO^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}), cationi grei (Hg^{2+}, Pb^{2+}), cationi lantanidici (Ce^{3+}), şi cationi actinidici (UO_2^{2+}). Se constată efecte foarte pronunţate la Be^{2+}, Mg^{2+} CO^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+} şi UO_2^{2+} şi se discută aceste efecte în funcţie de tipul lor (de substituţie, biuretic, reducător promotor, inhibitor etc.).

Deşi foarte mult întrebuinţată în dozarea proteinelor, metoda Lowry (1) continuă să aibă numeroase aspecte chimice nu numai interesante, dar în acelaşi timp şi mai puţin cunoscute. Pe măsura aplicării sale au apărut şi lucrări care au încercat să elucideze mecanismele reacţiilor implicate (2). S-au stabilit în acest fel condiţiile de eliminare a interferenţei unor substanţe (cum ar fi detergenţii) sau, pur şi simplu, s-a constatat măsura în care altele interferă (cum ar fi zaharurile) (3), (4), (5), (6), recomandîndu-se evitarea determinării sau practicarea sa cu prudenţă în asemenea situaţie.

Uneori, lucrările au sugerat posibilitatea că anumite substanţe îşi manifestă influenţa într-o anumită etapă a determinării, adică au tins către anumite precizări ale mecanismelor de reacţie.

Deşi lucrările referitoare la chimismul acestei metode nu sînt foarte abundente, există, fără îndoială, unele care încearcă tratarea sistematică a acestei probleme. Aşa cum este şi firesc, multitudinea aspectelor proceselor implicate nu este încă acoperită de cercetările de pînă acum. Sînt cu deosebire puţin cercetate — şi adesea numai în treacăt — influenţele unor cationi metalici, care există în mod normal în componenţa unor proteine (feritină, ceruloplasmină, hemocianină etc.,) precum şi a multor probe biologice (7), (8).

De aceea mi s-a părut interesantă cercetarea rolului unor cationi în diferitele etape ale determinării. Cationii primei serii p (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn), unii cationi deficienţi în electroni, adică mai slab ecranaţi (Be, Mg, Al), şi, în fine, un lantanid (Ce) şi un actinid (U) au fost cei pe care i-am considerat în primul rînd interesanţi. Am mai avut în vedere şi alţi cationi, cum ar fi Ag^{+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}.

MATERIALE ȘI METODE

Reactivul Folin-Ciocâlteu a fost preparat conform metodei Lowry cu modificările menționate de noi (9).

Substanțele folosite pentru prepararea sa au fost : $Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$ (Merk), $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ (Merk), H_3PO_4 (B.D.H.), HCl (Reactivul), LiCl (Reactivul) și Br_2 (Merck).

Proteina folosită a fost, din motive de standardizare și comparabilitatea rezultatelor, albumina serică bovină (fracțiunea a V-a, Calbiochem). Cationii, folosiți sub forma sulfaților lor, au fost următorii : $BeSO_4^*$ (Serva), $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ (Merck), $NaCr(SO_4)_2^*$ (Merck), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (Reactivul), $NaFe(SO_4)_2^*$ (Merck), $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ (Merck), $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ (Merck), $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18\,H_2O$ (U.C.B.), $Ce_2(SO_4)_3^*$ (Chemapol), $UO_2SO_4^*$ (Chemapol), $CdSO_4$ (Reactiful), Ag_2SO_4 (Merck) și $HgCl_2$ (Merck).

În cazul unora dintre acești cationi (marcați cu asterix mai înainte), sulfatul respectiv a fost obținut dintr-o altă sare : $BeSO_4$ din $BeCO_3$ (Serva) ; $NaCr(SO_4)_2$ din $NH_4Cr(SO_4)_2 \cdot 12\,H_2O$ (Merck) ; $NaFe(SO_4)_2$ din $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12\,H_2O$ (Merck) ; $Ce_2(SO_4)_3$ din $Ce_2(C_2O_4)_3$ (Chemapol) ; UO_2SO_4 din $UO_2(CH_3COO)_2$ (Chemapol). Mercurul și plumbul au fost singurii cationi folosiți sub forma clorurilor. Proteinele folosite au fost o proteină „neutră" — albumina serică bovină (fracțiunea a 5-a, Calbiochem) — , o proteină „acidă" — cazeinatul de Na (Serva) — și o proteină „bazică" — sulfatul de protamină (N. B. C.), care conținea 67—70% arginină.

Pentru a putea urmări efectul cationului asupra determinării proteinei am realizat următoarele situații, care se regăsesc sub forma coloanelor în tabela 1.

1. Determinarea proteinei (evident aceeași cantitate pentru toți cationii) folosind un reactiv Miller în care cuplul era înlocuit cu cantitatea echivalentă din cationul cercetat.

2. Determinarea proteinei cu un reactiv Miller preparat ca mai sus, cu deosebirea că, în locul proteinei, se pipetează apă.

3. Determinarea proteinei folosind același tip de reactiv Miller, dar pipetînd apă în locul reactivului Folin-Ciocâlteu.

Tabela 1

Cele patru variante ale reacției Lowry folosite

Reactivi \ Variante	1	2	3	4
Proteină	1 ml	—	1 ml	1 ml
Reactivi Miller cu cationi	1 ml	1 ml	1 ml	—
Reactivi Miller cu cationi și cupru	—	—	—	1 ml
Reactiv Folin-Ciocâlteu	3 ml	3 ml	—	3 ml
Apă distilată	—	1 ml	3 ml	—

Notă. Reactivi Miller cu cation de cercetat : 0,1 ml cation de cercetat (normalitate dublă), 0,1 ml apă, 0,2 ml tartrat de potasiu 4% și 4 ml reactiv alcalin (hidroxid de sodiu 0,05 N în carbonat de sodiu 10%). Se folosește 1 ml din acest amestec. Reactivi Miller cu cation de cercetat și cupru : este același ca mai sus ; în loc de 0,1 ml apă, se adaugă 0,1 ml sulfat de cupru (normalitate dublă).

4. Determinarea proteinei folosind un reactiv Miller care conținea, alături de cationul cercetat, și cantitatea echivalentă de cupru.

În felul acesta am obținut corespunzător următoarele rezultate :

1. **Efectul cationului cercetat fără influența altui cation, în special fără influența cuprului.**

2. Efectul reducător (cînd a fost cazul) al cationului cercetat asupra reactivului Folin-Ciocâlteu pentru a elimina pe cît posibil acest efect. De cîte ori am putut, am folosit cationi în trepte superioare de oxidare (Fe^{3+}, Hg^{2+}, UO_2^{2+}).

3. Efectul de complexare al cationului asupra proteinei în condițiile „reacției" Lowry.

4. Efectul cationului asupra determinării normale (cu CU^{2+}). Acesta poate fi în principiu de reducere sau de mărire a absorbanței. Evident, sînt de așteptat și cazuri cînd cationul „nu are nici un efect". Precizez că, chiar cînd valorile indică o asemenea situație, aceasta nu se întîmplă în realitate.

Așa cum reiese și din legenda tabelelor, în toate cazurile pentru o serie de cationi s-a lucrat cu aceeași cantitate de proteină. Din acest punct de vedere, cantitatea ca valoare în sine nu are prea mare importanță, efectele fiind vizibile, în principiu, la orice altă cantitate. Absorbanțele probelor au fost citite la trei lungimi de undă (750, 660 și 540 nm) la un spectrofotometru Spekol, folosind cuve cu drum optic de 1 cm. Toate probele au fost executate cel puțin în triplicat, valorile prezentate fiind media valorilor citite pentru aceste probe paralele. De foarte multe ori aceste valori coincideau. Pipetările au fost executate cu un set de pipete semiautomate, de precizie, Gilson. Procedeul folosit (10) a fost următorul: la un ml probă proteică (variantele 1, 3, 4) sau un ml apă (varianta 2) se adaugă un ml reactiv Miller modificat (variantele 1, 2, 3) sau reactiv Miller normal (varianta 4); se lasă 10 min la temperatura ambiantă, apoi se adugă 3 ml reactiv Folin-Ciocâlteu (variantele 1, 2, 4) sau 3 ml apă (varianta 3), după care se incubează la 52°C timp de 15 min. Se citesc absorbanțele în condițiile menționate.

Tabelele mai conțin rubricile 5, 6, 7, reprezentînd: rubrica 5 — diferența dintre valorile rubricilor 4 și 2, rubrica 6 — diferența dintre valorile rubricilor 4 și 1, și rubrica 7 — diferența dintre valorile rubricilor 1 și 2.

Am folosit și prezentat valorile absorbanțelor, și nu pe cele ale cantităților de proteină pe care le-ar fi reprezentat acestea, considerînd că ar fi fost o complicație inutilă și fără sens din punctul de vedere al scopului pe care mi l-am propus.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru a putea înțelege și interpreta mai rapid rezultatele experiențelor, voi face un scurt comentariu asupra valorilor prezentate în tabelele cu rezultate. În coloana 1 se găsesc întotdeauna valorile obținute folosind un reactiv Miller în care cuprul este înlocuit cu cationul cercetat. Aceste valori reprezintă *efectul global de substituție* al cationului. Îl numesc global deoarece include și un efect nespecific al cationului, adică acela al reactivului Folin-Ciocâlteu.

Al doilea efect îl numesc efect nespecific sau *efect reducător*: valorile care îl exprimă se găsesc întotdeauna în coloana 2 și se obțin folosind același reactiv Miller modificat, în locul probei de proteină folosindu-se apă distilată. În acest fel, cationul își va manifesta, dacă are, efectul reducător asupra reactivului Folin-Ciocâlteu; din punctul de vedere al determinării proteinelor, acest efect este nespecific. Acest martor are, după cum vom vedea, un rol destul de important, deoarece poate servi la corectarea efectului global de substituție prin scădere din acesta. Valoarea astfel obținută reprezintă adevăratul efect de substituție sau *efectul global propriu-zis de substituție*. Această valoare se găsește întotdeauna în coloana 7.

Influența unui cation ar putea să se exercite însă, și prin formarea unor compuși cu proteina care urmează să fie dozată. Pentru unii cationi, asemenea compuși se cunosc, iar pentru cupru se consideră că existența acestei etape de combinare cu proteina ar fi determinantă pentru mersul dozării proteinelor prin metoda Lowry. În dorința de a surprinde un asemenea efect, în condițiile metodei Lowry, care ar fi de natură să explice o eventuală influență a unui cation în determinarea proteinelor, am prac-

ticat o „determinare" a proteinei în care am înlocuit reactivul Folin-Ciocâlteu cu apă distilată. Am obținut astfel, în condițiile determinării proteinelor prin metoda Lowry, o reacție de tip biuret, pe care am favorizat-o prin înlocuirea reactivului Folin-Ciocâlteu cu apă. Valorile obținute se găsesc întotdeauna în coloana 3 și reprezintă combinarea respectivilor cationi cu proteina, în condițiile metodei Lowry, așa cum ar fi ele înregistrate la respectivele lungimi de undă. Acest efect, prin analogie cu cationul Cu^{2+}, se nu este *efect biuretic*

Știind că un cation poate influența determinarea prin înlocuirea cuprului, prin efectul reducător sau prin reacția sa directă cu proteina, următoarea problemă care se pune ar fi dacă aceste efecte pot cumva să modifice rezultatele determinării chiar în prezența cuprului. Pentru aceasta am folosit un reactiv Miller care conține aceeași concentrație din cationul de cercetat și cupru (evident, rămîne deschisă problema raportului reciproc al concentrațiilor perechii Cu^{2+} — cation considerate); valorile obținute în acest fel se găsesc în coloana 4 și reprezintă *efectul combinat global* al cationului respectiv și al cationului Cu^{2}. Valorile care depășesc valoarea obținută numai cu cationul Cu^{2+} reflectă, prin urmare, un efect cooperativ al cationului (o stimulare), în timp ce valorile mai scăzute traduc un efect supresiv (o suprimare). Din această cauză, scăderea valorilor coloanei 1 din aceste valori reprezintă o măsură a influenței cationului în determinare. Aceste valori se găsesc întotdeuna în coloana 6 și constituie *efectul rezidual* al cuprului. Scăderea valorilor coloanei 2 din valorile coloanei 4 reprezintă *efectul combinat propriu-zis*, adică efectul însumat al cationului și la cuprului, dar corectat împotriva participării efectului reducător. Cum efectul biuretic este în general nul (aceasta nu înseamnă că el nu există de o anumită manieră), am renunțat la a-l mai considera și pe acesta în vreo corecție.

Așa cum reiese din cele expuse, tratarea valorilor care exprimă aceste efecte drept mărimi aditive nu este, desigur, cea mai exactă rezolvare a problemei, dar este cea mai simplă pe care o am la îndemînă pentru început și permite formarea unei păreri, chiar și aproximative, asupra proceselor determinate de prezența cationilor metalici în situațiile menționate. Stabilirea exactă a raportului de combinare a tuturor factorilor implicați depășește cu mult scopul imediat și posibilitățile prezentei lucrări; din acest motiv, precizez că folosirea acestor termeni nu presupune pentru autor ideea că în realitate aceste efecte se manifestă aditiv. Prin cifrele prezentate se urmărește, mai degrabă, să se atragă atenția asupra lor într-un mod comparativ decît să fie propriu-zis cuantificate. Cu aceste cîteva precizări putem trece la analiza situației concrete a acestor efecte pentru diferite grupe de situații.

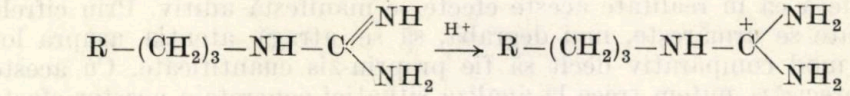
Astfel, pentru albumina serică bovină, la o concentrație de 70 μg/ml se observă (tabela 1) că, la toate cele trei lungimi de undă, efectul biuretic este absent; fac excepție Ag^{+} (0,01 la 750, 660 și 540 nm), Cu^{2+} (0,01 la 660 și 540 nm) și Fe^{3+} (0,02 la 540 nm). Efectul reducător este, în mod surprinzător, prezent la aproape toți cationii, deși într-o măsură foarte mică. În general, acest efect scade cu lungimea de undă. Mn^{2+} are, de departe, cel mai substanțial efect reducător (0,41 din 0,44 efect global de substituție la 750 nm; 0,30 din 0,32 la 660 nm; 0,18 din 0,19 la 540 nm).

Co^{2+} și Ni^{2+} au, de asemenea, efecte reducătoare apreciabile, dar mult sub cel al Mn^{2+}.

În mod cu totul neașteptat, Be^{2+}, Mg^{2+} și Al^{3+} manifestă asemenea efect. Este drept, el este mic, dar prezent la toate lungimile de undă și crește cu greutatea atomică. Așa cum este și normal, ionul Ag^{+} are și el efect reducător și de asemenea și ionul Ce^{3+}. Cu totul surprinzător pare acest efect la Zn^{2+}, chiar dacă se manifestă numai la 750 nm. Efectul global propriu-zis de substituție este foarte pronunțat la unii cationi. Astfel, la Ni^{2+} acest efect depășește valoarea respectivă a martorului de Cu^{2+} la toate cele trei lungimi de undă. Efectul combinat global ne obligă la recunoașterea unor cationi cu certe efecte activatoare. Mai elocvent încă, efectul combinat propriu-zis atestă, în ordine, următorii trei cationi: Cd^{2+}, Ni^{2+}, UO_2^{2+} cu următoarele triade de valori: 1,48;1,00; apoi 1,08; 0,79; 0,52 și 0,55; 0,39; 0,26.

În sfîrșit, cu privire la efectul global propriu-zis de substituție, notăm ca o curiozitate aparentă că cea mai mică valoare se întîlnește la Mn^{2+}, la care întîlnim cel mai pronunțat efect reducător. Evident, cationul consumat prin oxidare nu mai poate participa la reacție ca înlocuitor al Cu^{2+}. Insist asupra efectului spectaculos al cationului Cd^{2+}, care singur nu are decît circa 50% din efectul Cu^{2+}, dar la concentrație egală cu aceasta determină o creștere de absorbanță pînă la aproape 300%. Din acest motiv cred că reluarea acestui caz (ca și pentru Ni^{2+} și Co^{2+} de altfel) ar putea să conducă la realizarea unei metode cu o sensibilitate superioară metodei actuale. Un cation care în amestec cu cationii Cu^{2+} a condus la valori practic egale cu cele obținute în cazul Cu^{2+} singur a fost UO_2^{2+}, cation al cărui efect reducător este practic inexistent. Remarcile de pînă acum referitoare al albumina serică bovină își mențin valabilitatea și în cazul unor concentrații de proteină mult mai mari (200 sau 520 μg/ml).

Aceste rezultate sînt desigur destul de interesante, dar cred că valoarea lor nu poate fi înțeleasă decît prin comparație cu cele obținute în cazul altor tipuri de proteină. În această ordine de idei, prezentarea rezultatelor obținute lucrînd cu sulfat de protamină (tabela 3) mi se pare edificatoare. Este de reținut faptul că ne găsim în prezența unei proteine puternic bazice, ea însăși cu un foarte pronunțat caracter cationic; acest caracter este datorat grupărilor guanidil ale radicalilor arginil:



După cum se vede din reacție, în oricare situație am considera acest cation, el prezintă o simetrie inferioară guanidinei și cationului guanidiniu, prin aceasta scăzînd foarte mult și posibilitățile de stabilizare prin conjugare izovalentă. Acest fapt conduce pentru acest cation azotat la o mai mare disponibilitate a electronilor neparticipanți ai atomilor de azot. Este un fapt important întrucît, dacă există electroni neparticipanți la proteină, există și disponibilități de acceptare a lor la cationii seriei d. Aceștia, cu excepția Zn^{2+}, ca și a Ag^{+}, Ce^{3+}, Hg^{2+}, manifestă un pronunțat efect reducător pe care cu greu l-am putea asocia altui fapt.

Tabela 2

Variația absorbanței (la 750, 660 și 540 nm) cu cationul folosit la determinarea albuminei serice bovine (70 μg/ml) prin metoda Lowry. Coloanele 1—4 prezintă situațiile cînd : 1) cationul înlocuiește cuprul ; 2) cationul oxidează reactivul Folin-Ciocâlteu (în absența proteinei) ; 3) cationul reacționează cu proteina (în absența reactivului Folin-Ciocalteu) ; 4) cationul acționează în prezența cuprului. Coloanele 5, 6, 7 prezintă situația cînd : 5) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2 ; 6) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 1 ; 7) valorile din coloana 1 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2.

Cation	750 nm							660 nm							540 nm						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Be^{2+}	0,23	0,02	0,0	0,39	0,37	0,16	0,21	0,17	0,01	0,0	0,28	0,27	0,11	0,16	0,10	0,01	0,0	0,18	0,17	0,08	0,09
Mg^{2+}	0,28	0,03	0,0	0,42	0,39	0,14	0,25	0,19	0,01	0,0	0,30	0,29	0,11	0,18	0,12	0,01	0,0	0,20	0,19	0,08	0,11
Al^{3+}	0,22	0,02	0,0	0,49	0,47	0,27	0,20	0,16	0,01	0,0	0,37	0,35	0,20	0,15	0,09	0,01	0,0	0,23	0,22	0,11	0,08
Cr^{3+}	0,28	0,02	0,0	0,51	0,49	0,23	0,26	0,19	0,01	0,0	0,38	0,37	0,19	0,18	0,12	0,01	0,0	0,24	0,23	0,12	0,11
Mn^{2+}	0,44	0,41	0,0	0,74	0,33	0,30	0,03	0,32	0,30	0,0	0,55	0,25	0,23	0,02	0,19	0,18	0,0	0,36	0,18	0,17	0,01
Fe^{3+}	0,28	0,03	0,0	0,52	0,49	0,34	0,25	0,21	0,03	0,0	0,38	0,35	0,17	0,18	0,15	0,04	0,02	0,24	0,20	0,09	0,11
Co^{2+}	0,30	0,08	0,0	0,58	0,50	0,28	0,22	0,22	0,06	0,0	0,43	0,37	0,21	0,16	0,19	0,08	0,0	0,31	0,24	0,12	0,12
Ni^{2+}	0,78	0,12	0,0	1,20	1,08	0,42	0,66	0,62	0,07	0,0	0,87	0,79	0,24	0,55	0,48	0,03	0,0	0,55	0,52	0,07	0,45
Cu^{2+}	0,55	0,03	0,0	0,55	0,52	0,07	0,52	0,39	0,01	0,01	0,39	0,38	0,0	0,38	0,23	0,0	0,01	0,23	0,23	0,0	0,23
Zn^{2+}	0,25	0,10	0,0	0,52	0,42	0,27	0,15	0,18	0,0	0,0	0,37	0,37	0,19	0,18	0,10	0,0	0,0	0,24	0,24	0,14	0,10
Ag^{+}	0,33	0,09	0,01	0,56	0,47	0,23	0,24	0,24	0,06	0,01	0,41	0,35	0,17	0,18	0,15	0,03	0,01	0,28	0,25	0,13	0,12
Cd^{2+}	0,25	0,02	0,0	1,50	1,48	1,25	0,23	0,18	0,0	0,0	1,00	1,00	0,82	0,18	0,10	0,0	0,0	0,70	0,70	0,70	0,10
Hg^{2+}	0,25	0,02	0,0	0,41	0,39	0,16	0,23	0,18	0,01	0,0	0,29	0,28	0,11	0,17	0,10	0,0	0,0	0,19	0,19	0,19	0,10
Pb^{2+}	0,29	0,02	0,01	0,51	0,49	0,22	0,27	0,21	0,0	0,0	0,38	0,38	0,17	0,21	0,12	0,0	0,0	0,24	0,24	0,12	0,12
Ce^{3+}	0,24	0,07	0,0	0,38	0,32	0,14	0,18	0,18	0,07	0,0	0,28	0,22	0,10	0,12	0,12	0,02	0,0	0,18	0,16	0,06	0,10
UO_2^{2+}	0,27	0,01	0,0	0,56	0,55	0,29	0,26	0,20	0,0	0,0	0,39	0,39	0,19	0,20	0,12	0,0	0,0	0,26	0,26	0,14	0,12

Tabela 3

Variația absorbanței (la 750, 660 și 540 nm) cu cationul folosit la determinarea sulfatului de protamină (75 μg/ml) prin metoda Lowry. Coloanele 1—4 prezintă situațiile cînd : 1) cationul înlocuiește cuprul ; 2) cationul oxidează reactivul Folin-Ciocâlteu (în absența proteinei) ; 3) cationul reacționează cu proteina (în absența reactivului Folin-Ciocâlteu ; 4) cationul acționează în prezența cuprului. Coloanele 5, 6, 7 prezintă situația cînd : 5) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2 ; 6) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 1 ; 7) valorile din coloana 1 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2.

Cation	750 nm							660 nm							540 nm						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Be^{2+}	0,0	0,02	0,0	0,26	0,24	0,26	—	0,0	0,0	0,0	0,48	0,48	0,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,55	0,55	0,55	0,0
Mg^{2+}	0,0	0,02	0,0	0,32	0,30	0,32	—	0,0	0,0	0,0	0,35	0,35	0,35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,56	0,56	0,56	0,0
Al^{3+}	0,0	0,02	0,0	0,27	0,25	0,27	—	0,0	0,0	0,0	0,34	0,34	0,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,58	0,58	0,58	0,0
Cr^{3+}	0,02	0,03	0,0	0,38	0,35	0,36	—	0,0	0,0	0,0	0,40	0,40	0,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,61	0,61	0,61	0,0
Mg^{2+}	0,24	0,28	0,0	0,45	0,17	0,21	—	0,24	0,20	0,0	0,44	0,22	0,20	0,0	0,24	0,17	0,0	0,66	0,49	0,42	0,07
Fe^{3+}	0,0	0,05	0,0	0,38	0,33	0,38	—	0,0	0,03	0,0	0,38	0,35	0,38	—	0,0	0,0	0,0	0,57	0,57	0,57	0,0
Co^{2+}	0,10	0,08	0,0	0,40	0,32	0,30	0,02	0,12	0,04	0,0	0,48	0,44	0,36	0,08	0,18	0,14	0,0	0,81	0,67	0,63	0,04
Ni^{2+}	0,32	0,16	0,0	0,32	0,16	0,0	0,16	0,28	0,10	0,0	0,37	0,27	0,09	0,18	0,22	0,01	0,02	0,60	0,59	0,38	0,21
Cu^{2+}	0,22	0,03	0,0	0,22	0,19	0,0	0,19	0,34	0,02	0,02	0,34	0,32	0,0	0,32	0,51	0,0	0,03	0,51	0,51	0,0	0,51
Zn^{2+}	0,0	0,0	0,0	0,25	0,25	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,31	0,31	0,31	0,0	0 0	0,0	0,0	0,51	0,51	0,51	0,0
Ag^{+}	0,07	0,12	0,0	0,20	0,08	0,13	—	0,03	0,06	0,0	0,29	0,23	0,26	—	0,0	0,0	0,0	0,51	0,51	0,51	0,0
Cd^{2+}	0,0	0,02	0,0	0,20	0,18	0,20	—	0,0	0,0	0,0	0,31	0,31	0,31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,54	0,54	0,54	0,0
Hg^{2+}	0,02	0,06	0,0	0,15	0,09	0,13	—	0,0	0,03	0,0	0,14	0,11	0,14	—	0,0	0,0	0,0	0,20	0,20	0,20	0,0
Pb^{2+}	0,0	0,01	0,0	0,22	0,21	0,22	—	0,0	0,0	0,0	0,31	0,31	0,31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,54	0,54	0,54	0,0
Ce^{3+}	0,06	0,05	0,0	0,17	0,12	0,11	0,01	0,03	0,03	0,0	0,32	0,29	0,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,62	0,62	0,62	0,0
UO_2^{2+}	0,0	0,02	0,0	0,24	0,22	0,24	—	0,0	0,0	0,0	0,34	0,34	0,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,60	0,60	0,60	0,0

În privința efectului global de substituție remarcăm absența lui totală (la cele trei lungimi de undă) la cei trei cationi ușori: Be^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}. La aceștia însă persistă un efect reducător cert, dar numai la 750 nm; la 660 și 540 nm, el dispare. Acest fapt însă concordă cu scăderea generală a valorilor absorbanților cu lungimea de undă. Efectul global de substituție al cationilor este în general mic în cazul dozării sulfatului de protamină. Numai Ni^{2+} (0,32) și Mn^{2+}(0,22) au efecte care depășesc și, respectiv, egalează efectul Cu^{2+}(0,22), dar, dacă se consideră și efectele reducătoare, numai Ni^{2+} mai înseamnă ceva. Trebuie să mai subliniem în cazul sulfatului de protamină că în 11 cazuri din 16 efectele reducătoare sînt mai mari decît efectele globale de substituție. Acest fapt pune problema unei eventuale „competiții" a cationilor cu protamina pentru oxidant (reactivul Folin-Ciocâlteu), competiție din care, evident, poate pierde și protamina, care acționează probabil și ca un instrument de mobilizare a electronilor unora dintre cationi (Mn^{2+}, Ag^{+}, Ce^{3+}), și așa dispuși la acte de oxidare pe seama reactivului Folin-Ciocâlteu. Efectele biuretice sînt în general nule. Asemenea efect manifestă doar Cu^{2+} (și anume doar la 660 și 540 nm) și Ni^{2+} (numai la 540 nm). Cu toate acestea, efectele combinate globale și efectele combinate propriu-zise, adică acelea care dau măsura participării cationilor alături de Cu^{2+} la reacție, sînt mari (mai mari decît efectul Cu^{2+}) pentru mulți cationi: Be^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, UO_2^{2+}, la 750 nm. De altfel, situația este cam aceeași și la 660 și 540 nm. O comportare cu totul remarcabilă are Zn^{2+}, care, deși nu manifestă efect global de substituție, efect reducător și nici efect biuretic, conduce totuși la același efect combinat global ca și martorul de Cu^{2+}. Această comportare, părînd să traducă o anumită participare, sugerează că probabil este determinantă etapa redox, în care un cation cu stratul decompletat nu ar fi de așteptat să aibă un rol prea mare. Totuși, la 750 nm Zn^{2+} conduce, așa cum conducea și Cd^{2+} în cazul albuminei serice bovine (dar în proporție mult mai modestă decît aceasta), la o creștere a efectului combinat global, a efectului combinat propriu-zis și a efectului rezidual al Cu^{2+}; pentru acest reactiv, dar în cazul unei alte dozări, situația a mai fost observată (11). În general, valorile absorbanței crescînd cazul sulfatului de protamină odată cu scăderea lungimii de undă, adică invers față de albumina serică bovină. În fine, mai este de subliniat că cel mai mare efect combinat propriu-zis îl manifestă la 660 nm un cation deficitar în electroni, Be^{2+}, la care efectul global de substituție, efectul reducător și efectul biuretic au valoarea zero. Această comportare, deși foarte asemănătoare cu cea a Zn^{2+}, își are, evident, originea în cu totul alți factori de structură. Ridicarea absorbanței de la 0,32 (la Cu^{2+}) la 0,48, cît este în cazul Be^{2+} (adică cel mai mult din toată seria de cationi), sugerează că Be^{2+}, care nu poate avea nici efect reducător și nici biuretic, din motive de valență, are prin afinitatea sa pentru electroni un rol serios în mobilizarea lor, proces fără de care oxidarea nu se poate realiza.

Am considerat, bineînțeles, și o proteină foarte bogată în grupări anionice și aș fi fost bucuros ca ea să nu fi fost cazeinatul de Na, deoarece în privința lui interpretarea rezultatelor ca fiind datorate numărului mare de grupări COOH ar fi greșită. În acest caz, din păcate singurul accesibil mie, peste problema încărcăturii negative se suprapune și problema ana-

litică specială a prezenței grupărilor $-OPO_3H_2$. Prezența acestei grupări comportă trei aspecte:

1. Existența unei neomogenități de repartizare a sarcinii negative, gruparea aducînd nu una, ci două asemenea sarcini pe unitatea de spațiu și, în plus, fiind vorba de un grad de disociere cu mult mai pronunțat decît prin proprietățile analitice specifice ale fiecărui cation.

2. Gruparea $-OPO_3H_2$ cu distribuția ei își manifestă influența prin proprietățile analitice specifice ale fiecărui cation.

3. Gruparea $-OPO_3H_2$ poate ea însăși, într-un mod pe care momentan nu îl discut, să participe specific la formarea culorii albastre pe a cărei existență se întemeiază metoda.

Totuși, în linii mari, cazeinatul este mai apropiat, din punctul de vedere al interferenței cationilor în dozarea sa prin metoda Lowry, de sulfatul de protamină. În cazul cazeinatului de sodiu am prezentat date referitoare numai la cele două lungimi de undă extreme (750 și 540 nm) (tabela 4).

Voi începe deci cu 750 nm. În privința efectului global de substituție se constată că majoritatea cationilor au valori destul de apropiate de Cu^{2+}. Cel mai mic efect global de substituție îl manifestă Co^{2+} (aproximativ 50 % din Cu^{2+}), care în aceste condiții nu manifestă nici efect reducător, nici efect biuretic: el manifestă din acest motiv cel mai mare efect combinat propriu-zis (urmat foarte îndeaproape de Fe^{3+}) și cel mai mare efect rezidual al Cu^{2+}. Mg^{2+}, Mn^{2+} și Ag^{+} au, respectiv, 0,25, 0,27 și 0,70 (față de 0,25 Cu^{2+}) și manifestă fiecare cîte o particularitate: Mn^{2+} nu manifestă efect reducător și efect biuretic și are cel mai mare efect global propriu-zis de substituție (asemănător cu Be^{2+} în cazul sulfatului de protamină); Mn^{2+} manifestă un efect reducător pronunțat (50 % din efectul global de substituție); în fine, Ag^{+}, care are cel mai mare efect global de substituție (300 % față de Cu^{2+}), manifestă în același timp și cel mai mare efect reducător (aproximativ 200 % față de propriul efect global de substituție). Acest fapt îl recomandă în mod special atenției noastre, atît ca pe un cation interferent, cît și ca pe un posibil reactiv al unui procedeu de tip Lowry, dar, ca și în cazul Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, ar fi necesare cercetării ulterioare mai aprofundate. Efectul biuretic lipsește cu desăvîrșire la această lungime de undă. La 540 nm, singurul cation care manifestă un efect biuretic este Cu^{2+}. Efectul global de substituție al cationilor variază între aproximativ 40 și 80 % din cifra pentru Cu^{2+}. Efectul reducător însă furnizează la aceste lungimi de undă unele surprize: este prezent la Be^{2+} (și încă în mod apreciabil), este slab la Cr^{3+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} și este mare la Mn^{2+}, Co^{2+} și Ag^{+}, reprezentînd la aceștia patru, respectiv, 50, 75, 50 și 25% din efectele globale de substituție corespunzătoare.

Efectele combinate globale sînt mari (mult mai mari decît la 750 nm). Efectul combinat propriu-zis cel mai mare îl are Ag^{+} (0,66 față de 0,50 Cu^{2+}), urmat de Mn^{2+} și UO_2^{2+}, care au aceeași valoare (0,54). Aceeași ordine se menține și în privința efectului rezidual al Cu^{2+}, cifrele fiind pentru Ag^{+}, Mn^{2+}, UO_2^{2+} următoarele: 0,44; 0,38; 0,38. Al treilea este Fe^{3+} (cu 0,34).

Tabela 4

Variația absorbanței (la 750 și 540 m) cu cationul folosit la determinarea cazeinatului de sodiu (75 μg/ml) prin metoda Lowry. Coloanele 1—4 prezintă situațiile cînd : 1) cationul înlocuiește cuprul ; 2) cationul oxidează reactivul Folin-Ciocâlteu (în absența proteinei) ; 3) cationul reacționează cu proteina (în absența reactivului Folin-Ciocâlteu) ; 4) cationul acționează în prezența cuprului. Coloanele 5, 6, 7 prezintă situația cînd : 5) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2 ; 6) valorile din coloana 4 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 1 ; 7) valorile din coloana 1 sînt corectate prin scăderea valorilor corespunzătoare din coloana 2.

Cation	750 nm							540 nm						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Be^{2+}	0,19	0,0	0,0	0,20	0,09	0,01	0,19	0,18	0,03	0,0	0,47	0,44	0,29	0,15
Mg^{2+}	0,25	0,0	0,0	0,23	0,23	—	0,25	0,17	0,0	0,0	0,45	0,45	0,17	0,17
Al^{3+}	0,18	0,0	0,0	0,23	0,23	0,05	0,18	0,17	0,0	0,0	0,45	0,45	0,28	0,17
Cr^{3+}	0,19	0,0	0,0	0,24	0,24	0,05	0,19	0,18	0,01	0,0	0,45	0,44	0,27	0,17
Mn^{2+}	0,27	0,12	0,0	0,37	0,15	0,10	0,15	0,30	0,14	0,0	0,68	0,54	0,38	0,16
Fe^{3+}	0,20	0,0	0,0	0,25	0,25	0,05	0,20	0,16	0,01	0,0	0,50	0,49	0,34	0,15
Co^{2+}	0,12	0,0	0,0	0,27	0,27	0,15	0,12	0,43	0,27	0,0	0,63	0,44	0,20	0,13
Ni^{2+}	0,20	0,02	0,0	0,24	0,22	0,02	0,18	0,39	0,18	0,0	0,48	0,30	0,09	0,21
Cu^{2+}	0,23	0,0	0,23	0,23	0,0	0,23	0,23	0,52	0,02	0,01	0,52	0,50	0,0	0,50
Zn^{2+}	0,17	0,0	0,0	0,22	0,22	0,05	0,17	0,17	0,01	0,0	0,49	0,48	0,32	0,16
Ag^{+}	0,70	1,30	0,0	0,25	—	—	—	0,30	0,08	0,0	0,74	0,66	0,44	0,22
Cd^{2+}	0,19	0,0	0,0	0,27	0,27	0,08	0,19	0,15	0,0	0,0	0,46	0,46	0,31	0,15
Hg^{2+}	0,15	0,0	0,0	0,23	0,23	0,08	0,15	0,15	0,01	0,0	0,42	0,41	0,27	0,14
Pb^{2+}	0,17	0,0	0,0	0,23	0,23	0,07	0,17	0,15	0,01	0,0	0,47	0,46	0,32	0,14
Ce^{3+}	0,20	0,0	0,0	0,24	0,24	0,04	0,20	0,18	0,06	0,0	0,35	0,29	0,17	0,12
UO_2^{2+}	0,17	0,0	0,0	0,27	0,27	0,10	0,17	0,18	0,02	0,0	0,56	0,54	0,38	0,16

CONCLUZII

În urma studierii efectelor cationilor metalici asupra determinării proteinelor prin metoda Lowry, se observă următoarele:

1. Natura proteinei determină în mod hotărîtor, tipul de efect al cationului: albumina serică bovină, pe de o parte, şi sulfatul de protamină şi cazeinatul de Na, pe de altă parte, se comportă în mod diferit.

2. Influenţa cationului este dependentă de tipul său: uşor (Be^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}), p (Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}), lantanid (Ce^{3+}), actinid (UO_2^{2+}).

3. La cationii uşori, influenţa depinde adesea de masa atomică.

4. Influenţele cationilor, fiind foarte des destul de mari, trebuie avute în vedere ca factori de eroare, de aceea se impune eliminarea lor fizică (de exemplu prin dializă) sau teoretică (prin folosirea unor martori care să le evalueze influenţa).

5. Prin studierea mai aprofundată a efectelor lor, unii cationi pot deveni punctul de plecare al unor tehnici Lowry îmbunătăţite (Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+} Cd^{2+}, Ag^{+}).

6. Influenţa unor cationi care părea destul de puţin probabilă (cationii uşori), dar în nici un caz neaşteptată, se manifestă prin mecanismul care necesită precizări ulterioare.

Mulţumesc doamnei doctor Ligia Simionescu, şefa Laboratorului de imunochimie, din Institutul de endocrinologie „C.I. Parhon", pentru sprijinul acordat.

Prezentat la redacţie
la 8 decembrie 1981

Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti 17,
77748, Splaiul Independenţei nr. 296

THE INFLUENCE OF METAL IONS ON THE PROTEIN DETERMINATION BY THE LOWRY PROCEDURE

SUMMARY

The influences of various metallic cations on the protein determination by the Lowry procedure were systematically investigated using the appropriate modifications of this procedure. The used proteins were: a neutral one — bovine serum albumin — an acidic one — sodium caseinate — and a basic one — protamine sulphate.

The used types of cations were: light (Be^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}), p-type (Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}), heavy (Hg^{2+}, Pb^{2+},), lanthanide (Ce^{3+}) and actinide cations (UO_2^{2+}).

All these cations interfered with the protein determination by the Lowry procedure, in a characteristic way. There was a marked interference of the Be, Mn, Fe, Co, Ni, Cd, Ag, U cations in the Lowry procedure.

BIBLIOGRAFIE

1. O. H. LOWRY, N. P. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **192**, 205 (1951).
2. SHAO-CHIA CHOU, A. GOLDSTEIN, Biochem. J., **75**, 1091 (1960).
3. R. H. HINTON, M. L. E. BORGE, G. C. HARTMAN, Anal. Biochem., **29**, 248 (1969).
4. J. O. SULLIVAN, G. E. MATHISON, Anal. Biochem., **35**, 540 (1970).
5. M. ZAMFIR, St. cerc. biochim., **23**, 201 (1980).
6. H. L. ROSENTHAL, W. A. SOBIESTCZANSKA, Anal. Biochem., **34**, 591 (1970).
7. CHAI-HO LO, H. STELSON, Anal. Biochem., **45**, 331 (1972).
8. C. G. VALLEGO, R. LAGUNAS, Anal. Biochem., **36**, 207 (1970).
9. M. ZAMFIR, VL. GHEORDUNESCU, St. cerc. biochim., **24**, 109 (1981).
10. G. L. FOLIN, R. BLUJ, E. E. GLENNON, A. L. BURTON, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
11. O. FOLIN., V. CIOCÂLTEU, J. Biol. Chem., **73**, 627 (1927).

CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ŞI BIOCHIMICĂ A CELULAZELOR DIN *ASPERGILLUS NIGER*

M. ZAMFIR, S. S. VASU

Rezumat. A fost obţinut un preparat celulazic plecînd de la lichidele de cultură ale fungului *Aspergillus niger*. Celulaza obţinută avea un factor de purificare de 24, o masă moleculară mai mare de 30 000 daltoni, trei forme moleculare (vizualizabile în urma electroforezei), o temperatură optimă de 40°C şi un pH optim de 4,5. EDTA şi $B(OH)_3$ au efect inhibitor. Dintre cationi, Ba^{++} are cel mai pronunţat efect inhibitor. Activitatea enzimatică este în principal de tip C_x. Activităţile C_1 şi celobiozică reprezintă 2,92% şi, respectiv, 4,37% din activitatea C_x.

Degradarea celulozei a devenit o problemă de mare actualitate. Acest lucru necesită însă cheltuieli apreciabile de energie şi chimicale. Cea mai economică soluţie pare a fi celuloliza enzimatică, proces care se realizează mult mai uşor. Materiile prime de la care se pleacă sînt deşeuri şi subproduse fără valoare ale unor industrii, iar produsele secundare sînt materii prime valoroase pentru alte ramuri economice : alimentaţie, zootehnie, combustibil etc. Preparatele enzimatice provenind de la diverse microorganisme : fungi (1), basidiomicete (2), bacterii (3), plante superioare (4) etc., sînt deja cunoscute. Totuşi, obţinerea lor este dificilă şi se realizează pînă în prezent încă la scară de laborator, cel mult de staţie pilot.

Preocupările noastre în această privinţă au inclus : producerea celulozelor în culturi de *Aspergillus niger* pe medii folosind deşeuri şi subproduse ale industriei alimentare, în anul 1977 (5) ; izolarea şi purificarea celulazelor produse în aceste condiţii, în anul 1978 (6), şi, în cele ce urmează, caracterizarea fizico-chimică şi biochimică a acestor enzime.

MATERIAL ŞI METODE

Microorganismul folosit a fost *Aspergillus niger* ICA-34 (colecţia I.C.I.C.A.-Bucureşti).

Condiţiile de cultură. *Aspergillus niger* a fost cultivat pe un mediu avînd următoarea compoziţie în g/l : 10 g amidon comercial, 10 g extract de porumb, 60 g şrot de floarea-soarelui (fiert 30 min în 500 ml apă de robinet, filtrat prin tifon dublu, centrifugat la 4 000 rot/min şi reţinînd supernatantul), 3,3 g$(NH_4)_2HPO_4$, 2 g KH_2PO_4 şi 10 g $CaCO_3$. Mediul a fost adus la pH 6,0, folosind, după cum era cazul, H_3PO_4 sau KOH.

S-au reprezentat cantităţi de 150 ml în flacoane Erlenmeyer de 750 ml, după care a urmat sterilizarea prin autoclavare la 0,5 atm, timp de 30 min. Fiecare balon a fost însămînţat steril cu 6 000 000 spori. S-au obţinut culturi agitate (150 rot/min) la 28°C în vîrstă de 5 zile.

Prelucrarea probelor. Lichidele de cultură au fost separate de micelii prin filtrarea pe pînză de nylon. S-au reţinut lichidele de cultură deoarece enzimele care ne interesau sînt extracelulare. Purificarea a decurs conform schemei stabilite anterior (6). Fracţiunile cu cea mai bună

purificare (maximum fiind de 24 de ori) au fost reţinute şi folosite pentru cercetarea proprietăţilor enzimei. Un asemenea exemplu se prezintă în tabela 1.

Concentraţiile proteice au fost evaluate prin DO_{280} sau prin metoda Lowry (7). Este de remarcat faptul că rezultatele ambelor procedee erau alterate de prezenţa unor substanţe micromoleculare (pigmenţi, zaharuri etc.) ce nu se puteau înlătura cu totul, astfel încît purificările

Tabela 1

Purificarea celulazelor din lichidul de cultură de *Aspergillus niger* prin precipitare fracţionată cu acetonă şi cromatografiere pe DEAE-celuloză

Fracţiunea	Activitatea enzimatică (U/ml)	Conc. prot. (DO_{280}/ml)	Activitatea specifică (U/DO_{280})	Volum (ml)	Purificare X	Observaţii
Lichid de cultură	0,97	18,34	0,053	2 000	—	
Supernatant 40% acetonă	0,65	11,05	0,058	3 320	1	
Precipitat 90% acetonă	10,72	19,42	0,55	200	10	
Proba 1	5,52	7,30	0,75	5	14	
Proba 2	7,15	7,10	1,00	5	19	Aceste probe se reţin
Proba 3	10,07	7,80	1,29	5	24	
Proba 4	5,85	7,00	0,83	5	16	
Proba 5	4,87	6,40	0,76	5	14	
Proba 6	1,62	5,30	0,30	5	6	

atinse puteau fi în realitate mai mari decît se putea aprecia prin aplicarea acestor metode. Din încercări privind spectrul de absorbţie al colorantului (cu maxim la 500 nm) am tras concluzia că absorbţia pigmentului nu interfera cu determinarea proteinei prin absorbţie la 280 nm, ceea ce ne-a determinat să preferăm această metodă faţă de cea a lui Lowry.

Fracţiunea cu cea mai avansată purificare a fost supusă **ultrafiltrării** pe membrane Diaflo selective PM 30 şi UM 11.

Electroforeza preparatului celulazic şi identificarea activităţii celulazice a fracţiunilor s-au realizat la pH 7,9, în tampon Tris-acid citric 0,5 M, în plăci de acrilamidă 7%, care conţineau 0,1% CM-celuloză (sare de sodiu, Austranal), 2 ore, folosind un curent de 5 mA/cm. Apoi plăcile s-au imersat 10 min în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,2 M, pH 4,5 la 5°C, după care au fost scoase din tampon şi incubate 45 min la 40°C, în cameră umedă. Reacţia a fost stopată prin imersarea gelului în H_2SO_4 60%, 10 min. S-au făcut două spălări × 1 min cu apă distilată, după care gelul a fost scufundat în KI 2%, care conţinea 0,2% I_2, stînd astfel 30 min la temperatura camerei. Soluţia colorantă a fost înlăturată şi gelul spălat rapid cu apă distilată. Culoarea analoagă celei a amidonului constituie fondul, petele mai deschise sau albe localizînd enzima. Culoarea este stabilă o oră.

Pentru determinarea efectului diferiţilor cationi s-au preparat soluţii de CM-celuloză 1% în tampoane acid acetic-acetat de metal 0,05 şi 0,1 M, la pH 4,5.

Toţi anionii au fost folosiţi sub forma sărurilor lor de sodiu.

Determinarea activităţii celulolitice s-a executat conform metodei Miller şi colab. (8).

Definirea unităţii de activitate enzimatică. Cantitatea de enzimă care în 15 min măreşte DO_{640} cu 1,0 în condiţiile determinării constituie o unitate enzimatică (9).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Masa moleculară a celulazelor este mai mare de 30 000 daltoni, întrucît filtrarea prin membrană Diaflo UM 30, care permite trecerea numai o moleculelor cu masă mai mică de 30 000, nu a permis trecerea nici unui fel de activitate celulazică.

Preparatul a fost spălat pe acest filtru, pierzînd zaharurile reducătoare care îl însoţeau, dar nu şi pigmentul.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă a relevat prezenţa a trei fracţiuni cu migrare anodică în tampon alcalin, ceea ce ne face să presupunem că cele trei forme moleculare sînt bogate în grupări—COOH.

Lichidul de cultură, fracţiunea precipitată cu acetonă şi reluată cu apă şi fracţiunea de maximă puritate au prezentat acelaşi spectru electroforetic.

pH-ul optim al preparatului nostru se situează la 4,5, aşa cum reiese din tabela 2. În această privinţă rezultatele noastre diferă întrucîtva de cele ale lui Hurst şi colab. (10), care indică un pH optim de 4,0 pentru o celulază preparată din *Aspergillus niger* (el pleacă de la un preparat comercial).

Urmărind efectul temperaturii asupra activităţii enzimatice, am constatat, la pH 4,5 şi la timpul de incubare de o oră, că activitatea maximă corespunde temperaturii de 40°C, ceea ce se poate observa în tabela 3.

Acest rezultat trebuie considerat cu atenţia cuvenită, întrucît pentru preparatele brute activitatea creşte cu temperatura chiar după 55°C, ceea ce ridică problema protecţiei enzimei în stare purificată şi a folosirii în scopuri practice a unor preparate mai puţin purificate. Oricum, reţinem

Tabela 2

Dependenţa activităţii enzimatice a celulazei de pH

pH	Activitatea enzimatică	
	U/ml	% din activitatea maximă
2,0	0,0	0,0
2,5	0,98	9,73
3,0	2,60	25,80
3,5	3,90	38,70
4,0	6,17	61,30
4,5	10,07	100,00
5,0	6,82	67,70
5,5	5,20	51,60
6,0	3,57	35,45
6,5	2,27	22,60
7,0	0,65	6,45

Tabela 3

Dependenţa activităţii enzimatice a celulazei de temperatură

Temperatura	Activitatea enzimatică	
	U/ml	% din activitatea maximă
20°C	2,60	22,85
25°C	4,87	41,40
30°C	8,77	77,15
35°C	9,75	85,70
40°C	11,37	100,00
45°C	10,72	94,30
50°C	9,10	80,00
55°C	7,80	68,60
60°C	6,17	54,15

pentru preparatul nostru parţial purificat că temperatura optimă la pH 4,5 are valoarea de 40°C.

În privinţa efectului ionilor metalici şi anionilor asupra activităţii celulolitice a preparatelor noastre, putem spune că, dintre anioni, tartratul, citratul, acetatul, N_3^- şi H_2N-CH_2-COO nu au avut efect. EDTA disodic şi $B(OH)_3$ sînt net inhibitori.

În cazul cationilor, efectele sînt diferențiate în funcție de cationul folosit. Tabela 4 prezintă numai seriile : Li^+, Na^+, K^+, NH_4 și Mg^+, Ca^+, Sr^+, Ba^+. Așa cum reiese din această tabelă, celulazele răspund specific cationilor. Menționăm că acești cationi constituie numai o ilustrare par-

Tabela 4

Influența unor cationi asupra activității celulazice determinate la pH 4,5 în tampon acetat-acid acetic 0,1 M

Cation	Activitatea enzimatică	
	U/ml	% din activitatea maximă
Li^+	6,17	86,30
Na^+	7,15	100,00
K^+	6,50	90,90
NH_4^+	6,50	90,90
Mg^{++}	4,22	59,00
Ca^{++}	5,52	77,30
Sr^{++}	3,57	50,00
Ba^{++}	2,27	31,80

țială a fenomenului, deoarece au mai fost încercați și alți cationi. Reținem dintre aceștia Hg^{++}, care nu a influențat activitatea celulazică, ceea ce constituie o dovadă că în zona activă a enzimei nu ar fi implicate grupări—SH.

Asupra specificității de substrat a preparatului nostru nu se poate spune prea mult, deoarece, substratele de care dispunem nefiind suficient de bine caracterizate, interpretarea rezultatelor obținute ar fi dificilă. Celulozele substituite sînt în general schimbări de ioni celulozici, adică substanțe reticulate, care nu se pretează nici la atac celulolitic, nici nu-și află echivalent în natură.

Rezultatele prezentate de noi în tabela 5 trebuie luate prin urmare cu precauție. Prezentăm, din considerente de standardizare (tabela 6),

Tabela 5

Activitatea celulolitică a celulazelor pe diferitele tipuri de compuși celulozici (tampon acid acetic-acetat de sodiu, 0,1 M, pH 4,5)

Compusul	Activitatea enzimatică	
	U/ml	% din activitatea maximă
Celuloză	1,30	18,20
DEAE-celuloză	2,90	40,90
CM-celuloză	7,15	100,00
Hidrat-celuloză (celofan)	0,00	0,00

Tabela 6

Activitatea enzimatică a celulazelor asupra unor substrate caracteristice (în tampon acid acetic-acetat 0,1 M, pH 4,5)

Compus	Activitatea enzimatică			
	U/ml	U/mg proteină	%	de tip
Hîrtie Whatman 1	4,3	0,40	2,92	C_1
CM-celuloză	137,5	13,70	100,00	C
Celobioză	6,4	0,60	4,37	celobiazic

rezultatele care de obicei caracterizează specificitatea de substrat a preparatelor celulazice.

Singurul lucru care poate fi reţinut este că celulazele noastre îşi reduc activitatea cînd centrul lor activ este confruntat cu sarcinile pozitive ale substituenţilor din DEAE-celuloză.

CONCLUZII

1. Celulozele din *Aspergillus niger* prezintă trei forme moleculare, cu mobilităţi electroforetice apropiate.

2. Temperatura optimă a celulazelor parţial purificate din *Aspergillus niger* la pH 4,5 este de 40°C, dar ea depinde mult de gradul de purifate al enzimei, pentru o celulază nepurificată temperatura optimă tiind 55°C.

3. pH-ul optim al enzimei este de 4,5 în tampon acid acetic—acetat de sodiu 0,1 şi 0,05 M.

4. Anionii B $(OH)_3$ şi EDTA manifestă efect inhibitor net, citratul, tartratul, N_3^- neinfluenţînd enzima.

5. Cationii au efecte diferite : dintre cationii alcalini, Na^+ este asociat activităţii maxime, iar dintre alcalino-pămîntoşi, Ca^{++} este asociat celei mai mari activităţi. Hg^{-2} cation -SH blocant nu influenţează activitatea enzimei, aceasta neavînd probabil grupări -SH în zona activă.

6. Celuloza nesubstituită este atacată greu ; cel mai bine este atacată CM-celuloza şi mai greu decît ea DEAE-celuloza. Aceasta dovedeşte că enzima necesită o „afînare" a macromoleculelor, dar că o încărcătură pozitivă în imediata apropiere a zonei active nu este favorabilă acţiunii celulazice.

Prezentat la redacţie
la 10 decembrie 1981

Institutul de ştiinţe biologice
77748 Bucureşti 17,
Splaiul Independenţei nr. 296

THE PHYSICO-CHEMICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CELLULOLYTIC ENZYMES FROM *ASPERGILLUS NIGER*

SUMMARY

A cellulolytic enzyme was prepared from culture filtrates of *Aspergillus niger*. We have achieved a purification factor of 24. The molecular weight was higher than 30,000 daltons. There were three molecular forms visualized according to polyacrylamide gel electrophoresiss. The optimum temperature was of 40 and the optimum pH 4.5. The most inhibitory anions were EDTA and $B(OH)_3$ and the most inhibitory cation was Ba^{++}. The main enzyme activity is of C_x type. The C_1 and cellobiose activities represent 2.92% and respectively 4.37% from C_x activity.

BIBLIOGRAFIE

1. G. PETTERSEN, D. L. EAKER, Arch. Biochim. Biophys., **124**, 135 (1968).
2. J. G. SHEWALE, J. C. SADANA, Canad. J. Microbiol., **24**, 1204 (1978).
3. B. BERG, Canad. J. Microbiol., **21**, 51 (1975).
4. R. GOREN, M. HUBERMAN, Anal. Biochem., **75**, 1 (1976).
5. * * * *Producerea celulazelor în Aspergillus niger cultivat pe medii de cultură naturale (subproduse şi deşeuri ale industriei alimentare)*, Contract de cercetare cu Ministerul Educaţiei şi Învăţământului, 1977.
6. * * * *Purificarea celulozelor din fungi*, Contract de cercetare cu Ministerul Educaţiei şi Învăţământului, 1978.
7. H. O. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
8. G. L. MILLER, R. BLUM, W. E. GLENNON, A. L. BARTON, Anal. Biochem., **127**, 1, (1960).
9. * * * *Methods in enzymology*, vol. 8, sub red. P. O. COLOWICK, N. O. KAPLAN, Academic Press, New York-London, 1960.
10. P. L. HURST, J. NIELSEN, P. A. SULLIVAN, M. G. SHEPHERD, Biochem. J., **169**, 33 (1977).

REFERAT GENERAL

LIPOZOMII — PREPARARE, PROPRIETĂŢI, APLICAŢII

VICTORIA DOBRE

1. STRUCTURĂ. PROPRIETĂŢI
2. METODE DE PREPARARE
   2.1. Agitare manuală
   2.2. Sonicare
   2.3. Injecţie etanolică
   2.4. Injecţie eterică
   2.5. Cilindrii cohleali (cochleat cylinders)
   2.6. Dializă
   2.7. Evaporare în fază inversă (reverse phase evaporation)
3. NOMENCLATURĂ
4. CONSTITUENŢI LIPIDICI
5. INCLUDEREA MATERIALELOR ÎN LIPOZOMI
   5.1. În faza apoasă
   5.2. În faza lipidică
6. SEPARAREA MATERIALULUI NEINCLUS
7. NATURA INCLUDERII
8. DETERMINAREA RANDAMENTULUI DE INCLUDERE
9. PROBLEME ASOCIATE ADMINISTRĂRII LIPOZOMILOR *IN VIVO*
   9.1. Preparate sterile
   9.2. Soarta lipozomilor *in vivo* şi direcţionarea către ţesutul-ţintă
   9.3. Mecanismele încorporării în celulă
   9.4. Toxicitatea lipozomilor
   9.5. Aspecte imunologice
10. APLICAŢII
   10.1. În biologie
   10.2. În medicină
      10.2.1. Terapia enzimatică
      10.2.2. Chimioterapia cancerului
      10.2.3. Terapia antimicrobiană
      10.2.4. Boli de stocare a metalelor
      10.2.5. Adjuvanţi imunologici
      10.2.6. Tratamentul artritei reumatoide
      10.2.7. Terapia orală
      10.2.8. Carrier pentru polinucleotide
      10.2.9. Metode de diagnostic
   10.3. În imunologie

În ultimii ani a devenit tot mai evident faptul că problemele asociate utilizării directe a medicamentelor, între care inactivarea *in vivo*, direcţionarea către ţesutul ţintă, eliberarea treptată în celulă, ar putea fi rezolvate prin folosirea unui sistem carrier (13), (60), (93). Între sistemele propuse, lipozomii ocupă un loc central datorită avantajelor lor : sînt biodegradabili şi uşor de preparat, prezintă o remarcabilă variaţie a compoziţiei, mărimii, altor caracteristici structurale, generînd astfel o varietate de mecanisme prin care pot interacţiona cu celula (20), (26), (42), (43), (78), (90 , (95), (105), (106), (107), (108).

St. cerc. biochim., 25, *1*, 96—107 (1982)

1. STRUCTURĂ. PROPRIETĂȚI

Lipozomii sînt structuri artificiale, închise, formate din straturi bimoleculare lipidice (bilayer) concentrice, alterînd cu compartimente apoase, generate spontan la suspendarea fosfolipidelor într-un exces de mediu apos (4), (106).

Asemănător membranelor biologice, proprietatea fizică esențială a lipozomilor este permeabilitatea la apă, ioni, neelectroliți, ceea ce justifică utilizarea inițială drept modele de membrană pentru studii de transport (8), (34), (35), (36), (59), (112). Modificînd compoziția lipidică în bilayer, ceea ce corespunde schimbării temperaturii tranziției de fază și deci a fluidității membranei, este posibilă reducerea pierderii prin membrană a unei molecule particulare (95).

Abilitatea lipozomilor de a include apă și prin aceasta substanțe solvite a fost folosită pentru utilizarea lor drept vezicule „purtătoare" (20), (26), (40), (43), (90), (95), (105), (106).

Lizozimul a fost prima moleculă proteică inclusă în lipozomi (98).

2. METODE DE PREPARARE

Pentru includerea substanțelor de interes biologic, metoda inițială a reluării filmului lipidic, aparținînd lui Bangham (3), (4), cel ce a evidențiat structura lipozomală, a fost mereu diversificată în funcție de utilizarea preparatelor.

2.1. **Agitare manuală.** Lipidele sînt dizolvate în cloroform, care este ulterior îndepărtat prin evaporare rotativă la temperatură deasupra temperaturii de tranziție a lipidului component major; filmul lipidic obținut este reluat cu soluție apoasă prin agitare manuală (40), (41). Se obțin MLV de mărimi diferite. Metoda are avantajul simplității, dar conduce la un randament de includere scăzut.

2.2. **Sonicare.** Lipozomii MLV preparați prin metoda 2.1. sînt supuși iradierii ultrasonice, rezultînd lipozomi SUV, unilamelari (24), (40), (41).

2.3. **Injecție etanolică.** Metoda constă în injectarea soluției etanolice de PL în mediu apos și apoi concentrarea microveziculelor formate (6). Se obțin lipozomi uniformi ca formă, dar, îndepărtarea solventului nefiind controlată, acesta în urme poate împiedica unele experiențe cu preparatul lipozomal.

2.4. **Injecție eterică.** Deamer (19) injectează soluția eterică de PL în mediu apos încălzit deasupra punctului de fierbere al eterului. Asemănător metodei 2.3, și aceasta necesită aparatură specială, și, în plus, nu poate fi folosită pentru includerea substanțelor labile termic.

2.5. **Cilindrii cohleali (cochleat cylinders).** Lipozomii SUV sînt fuzionați cu ajutorul Ca^{2+} (79), (80), (81), (82), (83). Cilindrii cohleali sînt fază intermediară în procesul fuziunii, observată prin metoda freeze-fracture. Îndepărtînd Ca^{2+} cu EDTA, aceștia se transformă în vezicule mari unilamelare, deja folosite pentru introducerea macromoleculelor în celule (83). Singura limitare a metodei este legată de folosirea exclusivă a PS (106).

2.6. **Dializă.** Soluția apoasă de proteină este amestecată cu lipidele în prezența detergentului, care este îndepărtat prin dializă. Lipidele și

proteina formează lipozomi cu proteina încorporată în bilayer. Metoda este folosită pentru reconstituire de sisteme enzimatice membranare (106). Detergentul poate fi îndepărtat şi prin gel-filtrare (12) sau prin dializă rapidă şi controlată (65), (74), (97), (117).

2.7. **Evaporare în faza inversă (reverse plase evaporation).** Soluţia apoasă este amestecată cu cea de PL în solventul organic. Ultimul este îndepărtat prin evaporare sub presiune redusă (103). Veziculele REV unilamelare obţinute au raportul volum apos/lipid de 4 sau 30 de ori mai mare decît lipozomii MLV, respectiv SUV. Se pot astfel încapsula numai molecule hidrosolubile (medicamente, proteine, acizi nucleici).

Într-o altă variantă (5), miceliile inverse formate ca mai sus sînt centrifugate la 30 000 × g pentru 30 min. Lipozomi mici cu procent ridicat de fază apoasă inclusă sînt regăsiţi în stratul inferior, apos.

3. NOMENCLATURĂ

Pentru evitarea confuziilor (95) s-a adoptat următorul sistem: MLV (multilamellar vesicles) pentru lipozomii preparaţi prin agitare manuală; SUV (small unilamellar vesticles) pentru cei obţinuţi prin sonicare; LUV (large unilamellar vesicles) pentru cei obţinuţi prin injecţie etanolică şi eterică sau prin fuziune cu Ca^{2+}; REV (reverse phase evaporation) pentru lipozomii obţinuţi prin 2.7. Termenii de lipozomi şi vezicule sînt interschimbabili.

4. CONSTITUENŢI LIPIDICI

Au fost de asemenea adoptate (95) următoarele prescurtări pentru constituenţii lipidici lipozomali: L(lipid); PL (phospholipid); PC (phosphatidylcholine, lecitina); C (cholesterol); PS (phosphatidylserine; PI (phosphatidylinositol); PE (phosphatidylethanolamine); PA (phosphatidic acid); DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine); DPPE (dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine); DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine); SM (sphingomielin); DCP (dicetylphosphate); SA (stearylamine).

Numai PE formează singură vezicule închise. Celelalte fosfolipide se folosesc combinate între ele şi/sau cu colesterolul: L : C (7 : 1); (1 : 1); (4 : 1), L : C : SA (7 : 2 : 1); L : C : DCP (7 : 2 : 1); L : C : PA (7 : 2 : 1) etc., în funcţie de utilizarea lipozomilor. Astfel, SA, DCP sau PA, prin efecte electrostatice de respingere, cresc spaţiul dintre două bilayer adiacente şi prin aceasta volumul apos inclus. C crescut scade permeabilitatea membranei la molecule mici (100). Locul C în membrană poate fi evidenţiat prin freeze-fracture după complexare cu digitonină (28) şi cu saponine sau filipine (27) (32).

Drept componenţi membranari mai pot fi folosiţi dihexadecilfosfatul (75), acizii graşi liberi (66), (106), sau extracte lipidice de membrane eritrocitare (3) sau celulare (109).

În cazuri particulare,cum ar fi administrarea la om, componenţii lipidici sînt aleşi cu grijă (95).

5. INCLUDEREA MATERIALELOR ÎN LIPOZOMI

5.1. **În faza apoasă.** Substanțele solubile în apă sunt incluse sub formă de soluție folosind metodele 2.1.-2.4.-2.6. Lipozomii rezultați includ materialul hidrosolubil în ordinea REV >LUV >MLV > SUV. De regulă, creșterea puterii ionice reduce includerea datorită neutralizării sarcinii lipidelor încărcate; tampoanele utilizate sînt 5—50 mM Tris/HCl sau fosfat pH 7,0—7,4. Se includ astfel enzime (1), (14), (40), (45), (52), (53), insulina (84), (85), (86), (87), hormonii tiroidieni, agenți chelatori etc. (95).

5.2. **În faza lipidică.** Substanțele lipofile se includ în însuși stratul lipidic, fiind adăugate la soluția organică de lipide, care fie că se transformă în film lipidic ulterior reluat cu tampon, fie că în ea se injectează faza apoasă. Astfel se includ actinomicina D (37), steroizii antiinflamatori (100) etc.

6. SEPARAREA MATERIALULUI NEINCLUS

Fracțiunea de substanță activă care în cursul preparării lipozomilor rămîne în afara acestora poate fi îndepărtată printr-o tehnică adecvată: dializă (90), (95), gel-filtrare (24), (56), (95), (99), (106), (110), centrifugare (90), (95), (106) sau ultrafiltrare (95), (106),

7. NATURA INCLUDERII

Desemnînd inițial încorporarea materialelor în faza apoasă lipozomală, includerea s-a dovedit un fenomen complex guvernat de diversele tipuri de interacțiuni între lipide și substanțele de inclus (95), (106). Din punct de vedere practic, uneori este absolut necesară cunoașterea naturii acestei interacțiuni, cum este cazul includerii enzimelor; enzima adsorbită poate reacționa cu Ac proprii, cauzînd severe reacții secundare după administrarea repetată a lipozomilor. Din punct de vedere teoretic, cunoașterea naturii acestei interacțiuni creează premisele optimizării includerii (29). Alteori, încorporarea la suprafața lipozomală este avantajoasă, ca în cazul unor detergenți care favorizează interacțiunea PL membranei lipozomale cu proteinele C-reactive implicate în procesele inflamatorii (110).

8. DETERMINAREA RANDAMENTULUI DE INCLUDERE

Randamentul de includere este parametrul indispensabil cuantificării efectului *in vivo* al materialului inclus. El poate fi determinat drept activitate enzimatică latentă (inclusă) folosind triton X-100 (24), (40), drept activitate imună folosind reacția Ag-Ac (25), care elimină eventuala interferență a detergentului cu reacția enzimatică (69), (98), sau ca radioactivitate utilizînd trasori radioactivi, cum este cazul includerii insulinei (15), (54), (86), (87), bleomicinei sau polivinilpirolidonului (17), steroizilor (100), metotrexatului (61) etc.

Exprimarea includerii drept „% din material inițial" tinde să fie înlocuită printr-o exprimare mai exactă în Moli sau mg/mg lipid lipozomal, mai utilă pentru compararea rezultatelor obținute de diferiți autori (95), (106).

9. PROBLEME ASOCIATE ADMINISTRĂRII LIPOZOMILOR *IN VIVO*

9.1. **Preparate sterile.** Tehnica aseptică poate fi aplicată la majoritatea stadiilor de preparare a lipozomilor. Antibioticele pot fi adăugate fazei apoase lipozomale la preparare. Lipozomii mici pot fi sterilizați prin ultrafiltrare. Se mai poate folosi și sterilizarea prin iradiere. Final, în special pentru preparatele de uz uman, lipozomii trebuie supuși unui riguros test standard de pirogenitate (41), (95).

9.2. **Soarta lipozomilor *in vivo* și direcționarea către țesutul-țintă.** Lipozomii nemodificați prezenți în circulație se acumulează preferențial în celulele sistemului reticuloendotelial (celulele Kupffer ale ficatului și macrofagele splinei). O astfel de încorporare poate fi modificată prin ajustarea formei, sarcinii de suprafață și compoziției lipozomilor; MLV sînt preluați rapid de ficat și splină; SUV se mențin mai mult în circulație, crescînd astfel posibilitatea atingerii altor țesuturi (22). În consecință, în tratamentul bolilor în care sînt implicate ficatul și splina, o astfel de preferință a lipozomilor este util folosită (44), (106).

Există cazuri în medicină care necesită tratamentul altor țesuturi-țintă. Una din cele mai interesante și folositoare aplicații ale lipozomilor este posibila lor direcționare *in vivo* prin „îmbrăcarea" cu Ac specifici celulelor-țintă (39), (44), (50), (57), folosirea fetuinei desializate cu afinitate selectivă pentru celulele parenchimale sau „îmbrăcarea" cu Ig-agregate termic (111).

Recent, Gregoriadis și colab. (48), (49), folosind SUV „îmbrăcați" cu Ac, au obținut direcționare specifică *in vitro* față de celule „îmbrăcate" cu Ag sau *in vivo* față de Ag liber.

9.3. **Mecanismele încorporării în celulă.** Caracteristicile lipozomilor (sarcină, mărime, compoziție lipidică) sînt de importanță majoră în determinarea căilor de interacțiune lipozomi-celulă. Manipulînd aceste caracteristici, este posibil a elimina unele mecanisme de interacțiune și a favoriza selectiv altele. *In vitro*, interacțiunea lipozomilor cu celulele poate avea loc prin mai multe mecanisme, dintre care unul ar fi preponderent: endocitoză; difuzie de schimb și/sau transfer de componenți membranari între vezicule și celule; adsorbția veziculelor la suprafața celulară, urmată de fuziunea cu membrana plasmatică (78), (89).

In vivo, aceleași mecanisme ar fi responsabile de încorporarea lipozomilor în celulă, fiind dependente atît de calea de administrare (i. v. sau i. p.), cît și de caracteristicile lipozomilor (113). Magee (68) consideră fagocitoza drept mecanism exclusiv de încorporare în celulă a lipozomilor conținînd polinucleotide.

În plasmă, lipozomii se asociază lipoproteinelor plasmatice de mare densitate (HDL) (96).

9.4. **Toxicitatea lipozomilor.** Avantajele obținute cu medicamentul inclus în lipozomi pot fi contracarate prin efecte toxice.

Carrier-ul lipozomal poate fi toxic fie direct, fie datorită schimbărilor metabolice pe care le induce, efectul toxic manifestîndu-se în diferite moduri: lipozomii peste o anumită mărime pot să blocheze capilarele; suprafața lipozomală încărcată pozitiv poate lega α_2-macroglobulinele circulante; lipidele improprii organismului pot induce serioase efecte toxice (44).

Lipozomii cu SA sau DCP, injectați intracerebral la șoarece în cantități crescute, au produs necroza țesutului cerebral. În schimb, în tratamentul i. p. de lungă durată la șoarece, lipozomii cu SA nu au fost toxici. Același rezultat s-a obținut cu PC : C : SA (7 : 2 : 1). Recent, studii sistematice asupra toxicității lipozomilor la șobolan și cîini tratați cîteva luni i. v. cu PC din soia sonicată au relevat la doza de 1 g lipid /kg corp numai unele creșteri tranzitorii ale grăsimilor totale.

Toxicitatea lipozomilor trebuie privită ca relativă unei situații date (44); acceptarea unui preparat lipozomal pentru uz clinic va depinde de efectul global, favorabil pentru pacient.

9.5. **Aspecte imunologice.** Se cunoaște de mult timp antigenicitatea unor lipide proprii organismului, de exemplu cardiolipin cu Ac prezenți la pacienți cu sifilis. Relevată recent a fost numai importanța structurii bilayer pentru producerea antiserurilor specifice lipidelor. Mai mult, a fost demonstrată necesitatea absolută a unui lipid pentru producerea Ac specifice altui lipid, ambii prezenți în bilayer. În toate aceste studii, structura membranară se dovedește a fi indispensabilă, singura capabilă să prezinte lipidul într-o formă antigenic-activă (106).

Altă situație de inducere a reacțiilor imunologice ar fi aceea a proteinelor incluse în lipozomi prin porțiunile necatalitice, expuse la suprafața externă. Acestea și alte antigene incluse în lipozomi ar putea fi mai imunoreactive decît aceeași doză de proteină sau Ag liber.

10. APLICAȚII

Aplicarea lipozomilor în sistemele biologice ca atare sau în asociere cu agenți activi are două aspecte corelate: folosirea lipozomilor în studiul sau modificarea comportării entităților biologice și aplicarea rezultatelor astfel obținute în scopul îmbunătățirii acțiunii medicamentului inclus în tratamentul și prevenirea bolilor.

10.1. **În biologie.** Folosindu-se lipozomii ca atare sau ca purtători de substanțe incluse, au fost investigate o serie de procese biologice (20), (22), (33), (44), (71), (72), (70), (77), (78), (79), (88), (114), (115), (116): modele de membrană și studii de transport prin membrană; metabolismul celulelor relevîndu-se rolul lizozomilor în degradarea intracelulară a proteinelor; degradarea proteinelor plasmatice în țesuturi; schimbări metabolice avantajoase induse de componenți lipidici membranari; modificarea sistemelor biologice *in vitro*; schimbarea selectivității membranelor biologice față de molecule particulare, precum și a rezistenței celulare; folosirea lipozomilor în inginerie genetică; studii metabolice altfel împiedicate de dificultăți tehnice etc.

10.2. **În medicină.** Acțiunea selectivă a medicamentelor este de primă importanță pentru aplicarea cu succes a acestora în tratarea sau preveni-

rea bolilor. O problemă majoră este inabilitatea anumitor medicamente de a îmbogăți regiunile țintă.

Natura versatilă a carrier-ului lipozomal permite o largă aplicabilitate (potențială) în îmbunătățirea selectivității și a acțiunii medicamentelor (44), (45), (95), (104).

10.2.1. *Terapia enzimatică.* Bolile de stocare lizozomală sînt caracterizate prin lipsa uneia (sau a mai multor) enzime lizozomale cu acumularea substratului în țesuturi și eliminare în urină (23), (38). Tratamentul acestor deficiențe enzimatice cu enzime libere izolate din surse umane sau străine este împiedicat de reacții imunologice, care pot inactiva enzima liberă (38) și periclita viața pacientului.

Transportul agenților activi incluși în lipozomi chiar la locul deficienței enzimatice, lizozomii, oferă o cale unică de testare a carrier-ului lipozomal în tratarea bolilor de stocare (44), (95). Enzima este astfel protejată în circulație de membrana lipozomală și ulterior eliberată intracelular numai după încorporarea lipozomilor și degradarea membranei lipidice. Într-o atare situație, pentru includere pot fi folosite și componente depărtate antigenic (24) (25).

Lipozomii conținînd glucamilază din *A. niger* sau β-fructofuranozidază (invertază) s-au acumulat în ficat și splină (47), (52) și subcelular în lizozomii ficatului (51), (52), (53), lipozomii îndeplinind astfel criteriile unui agent lizozomotropic, subliniate de De Duve și colab. (26).

Manozidoza experimentală a fost tratată cu manozidază inclusă (85). *In vitro*, cu enzimă inclusă s-a lucrat pe fibroblaste de la pacient cu boală tip II de stocare a glicogenului, pe ficat încărcat experimental cu dextran (14), pe lizozomi încărcați experimental cu sucroză (45) etc. (44).

In vivo s-au obținut rezultate încurajatoare în boala Gaucher a adultului, enzima deficientă fiind glucocerebrozid -β-glucozidaza, sistemul reticuloendotelial fiind cel afectat (10), (44).

Potențial, există posibilitatea tratării anumitor maladii genetice folosind enzime incluse în lipozomi (44), (95). O metodă de testare a preparatului enzimatic lipozomal, ușor aplicabilă în alte boli de stocare lizozomală, a fost recent dezvoltată (44) pentru GM_1 gangliozidoza experimentală, boală de stocare ce apare în mod natural.

O discuție asupra lipozomilor drept carrier de enzime s-ar extinde și în cazul tratamentului unor leucemii (95).

10.2.2. *Chimioterapia cancerului.* Lipozomii influențează eliminarea citotoxicelor incluse, le protejează de inactivare, crește selectivitatea și determină soarta și reținerea acestora în corp (21), (29), (44), (95), (105). Pierderea moleculelor mici de tipul citotoxicelor poate fi prevenită prin creșterea C în membrana lipozomală (44).

Pentru studiul cancerului s-au folosit lipozomi cu ^{111}Inbleomicină (17), (44), ^{99m}Tc (94), actinomicina-D, ara-C, asparaginază (44), metotrexat (3), (61), limfokine (30) etc.

10.2.3. *Terapia antimicrobiană.* Proprietatea sistemului reticuloendotelial de a prelua masiv lipozomii a fost folosită în tratarea unor boli parazitice care implică macrofagele (37), între care malaria (44), (109), și a altor infecții bacteriene, fungice sau virale (44). Dihidrostreptomicina inclusă are efect *in vitro* asupra *Staphylococcus aureus* fagocitar (9).

Interacțiunile posibile ale virusurilor incluse cu celulele sînt sugestiv prezentate de Magee (68).

10.2.4. *Boli de stocare a metalelor.* O problemă majoră în tratarea intoxicațiilor metalice, în care metalele se acumulează intralizozomal, cu agenți chelatori este slaba penetrare a acestora în celule. Rahman (91), îndepărtează cantități însemnate de plutoniu din ficatul încărcat experimental cu metal; același grup (91) a extins cercetările asupra eliminării mercurului și a aurului coloidal. Recent (44), folosirea ^{14}C-EDTA-fosfatidiletanolaminei crește includerea chelatorilor și previne pierderea din lipozomi prin difuzie.

10.2.5. *Adjuvanți imunologici.* Cei actuali, destul de numeroși sînt uneori susceptibili datorită efectelor secundare (44).

Comparativ cu alți adjuvanți (adjuvant Freund complet), cei lipozomali nu produc granulom și, în plus, elimină reacțiile de hipersensibilitate. DCP în lipozomi crește caracterul adjuvant al acestora, dimpotrivă, absența DCP sau înlocuirea cu FA reduce efectul adjuvant. Imunogenicitatea derivaților PE nu a depins de prezența DCP, SA, C în structura lipozomală (44). MLV formați din PC este un adjuvant biodegradabil, mai puternic și fără activitate imunogenică proprie (92).

Almeida și colab. (2) obțin „virusomes" cu structură asemănătoare virusului nativ (influenza virus), formați prin asocierea subunităților de virus cu lipozomii. Legarea dependentă de Ac a lipozomilor conținînd haptene la macrofage poate fi urmărită cinetic (64). Imunizarea cobailor este avantajoasă folosind Hb_sAg încorporat în lipozomi comparativ cu Ag liber (69), (70). Invers, lipozomii conținînd Ac antivirali protejează celulele de infecția virală (67). Folosindu-se o varietate de Ag, proprietatea de adjuvant imunologic a lipozomilor a fost confirmată de mai multe laboratoare (44).

10.2.6. *Tratamentul artritei reumatoide.* În 1976, Shaw și colab., (101) prezentau reținerea lipozomală a unui steroid antiinflamator modificat, folosit ulterior în tratamentul intraarticular al artritei reumatoide (44), (100).

Creșterea C în membrană și folosirea steroizilor mai potenți și chiar a amestecurilor de steroizi favorizează eficacitatea preparatelor lipozomale (31), (100).

10.2.7. *Terapia orală.* Posibilitatea administării orale a compușilor neabsorbabili incluși în lipozomi a fost investigată *in vitro* pe sac intestinal (11) și *in vivo* (44), (46) cu polimerul PVP (polivinilpirolidon), total neabsorbabil în formă liberă, servind drept medicament model.

Este cunoscută instabilitatea insulinei libere în tractul digestiv, fapt care a împiedicat utilizarea orală în diabet.

De la descoperirea insulinei, mulți cercetători au încercat ușurarea absorbției insulinei folosind adjuvanți, tentative nereușite din punct de vedere terapeutic. Dar chiar acele experiențe au demonstrat o oarecare absorbție și activitate hipoglicemică a hormonului (84).

Din 1974, problema absobției insulinei a fost reluată, folosindu-se insulină inclusă în lipozomi formați din PI (7). Administrată oral, insulina inclusă în diferiți lipozomi a provocat șoc hipoglicemic la șoarece (7), a scăzut glicemia la șobolani normali și diabetici (17), (54), (86) (Motaș,

Dobre și colab., date nepublicate) și a crescut net toleranța la glucoză a animalelor diabetice (54).

Absorbția insulinei este deocamdată scăzută (15), (84), (87), fiind dependentă de compoziția lipidică lipozomală (16), respectiv de stabilitatea membranei lipozomale față de factorii digestivi, ca enzime, ioni, săruri biliare (15), (16), (18), (77), (87), de mărimea lipozomilor etc. (43), (44), (54), (84).

Asocierea insulinei cu PI lipozomal crește includerea, protecția în mediul digestiv și transportul în sînge al hormonului (7), (17).

Depășirea problemelor asociate carrier-ului lipozomal de insulină spre a-l face adecvat utilizării în clinică va fi posibilă numai după studierea factorilor complecși, care în prezent limitează eficacitatea hormonului inclus (44), (54), (84), (94).

10.2.8. *Carrier pentru polinucleotide.* Tropismul lipozomilor pentru ficat și splină ar putea fi avantajos folosit la creșterea rezistenței la infecții virale prin poliribonucleotide incluse, inductori potenți ai interferonului, sintetizat preponderent în organele menționate (68).

10.2.9. *Metode de diagnostic.* Diagnosticul timpuriu al neoplasmelor primare creează posibilitatea unui tratament curativ mai mult decît paleativ.

Există deja un volum considerabil de informație asupra celor mai buni radionuclizi pentru diagnostic și asupra modului de încapsulare în liporomi (73). Diferitele caracteristici lipozomale pot influența captarea în țesut (73), (94).

10.3. **În imunologie.** Imunologia s-a dezvoltat mult în ultimii ani, interesul imunologilor îndreptîndu-se spre biochimie și mai recent spre biofizica membranei (44).

Lipozomii sînt deja folosiți pentru studiul Ag de membrană, drept imunogene și drept ținte pentru atacul imun (44), (58), (62), (110). Utilizînd lipozomi, se studiază imunogenicitatea haptenelor sau a altor Ag incluse, atacul imun mediat prin Ac și C (complement), activarea căii alternative a C, fenomenul de „liză reactivă", implicația proteinelor C-reactive în medierea și modularea proceselor inflamatorii acute etc. Dependența activității sau depleției C de starea fizică a lipozomilor (fluiditatea) sugerează implicarea fluidității membranei în procesele imunologice.

Prezentat la redacție
la 8 decembrie 1981

Institutul de științe biologice
Splaiul Independenței nr. 296
77748, București 17,

BIBLIOGRAFIE

1. A. C. ALLISON, G. GREGORIADIS, Nature, **252**, 252 (1974).
2. J. D. ALMEIDA, C. M. BRAND, D. C. EDWARDS, T. D. HEATH, Lancet, **ii**, 899 (1975).
3. A. D. BANGHAM, Progr. Biophys. Mol. Biol., 18, 29 (1968).
4. A. D. BANGHAM, în *Liposomes in Biological Systems* sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 1.
5. BATELLE MEMORIAL INSTITUTE, Republic of South Africa, Department of Commerce, Letters Patent, Nr. 76/0213 (1977).
6. S. BATZRY, E. D. KORN, Biochim. Biophys. Acta, **298**, 1015 (1973).

7. A. G. BAYER, Institute National de la Propriété Industrielle, France: Demande de Brevet d'Invention No. 2221/22 (1974).
8. R. BITTMAN, L. BLAU, Biochemistry, **11**, 4831 (1972).
9. P. F. BONVENTRE, G. GREGORIADIS, Antimicrob. Agents for Chemother., 13, 1049 (1978).
10. I. P. BRAIDMAN, G. GREGORIADIS, Biochem. J., **164**, 439 (1977).
11. J. F. BRIDGES, P. C. MILLARD, J. F. WOODLEY, Biochim. Biophys. Acta, **544**, 448. (1978).
12. J. BRUNNER, P. SKRABAAL, H. HAUSER, Biochem. Biophys. Acta, **455**, 322 (1976).
13. T. M. S. CHANG, Lucrările Congresului internațional de farmacie, Helsinki, 1976 p. 81
14. C. M. COLLEY, B. E. RYMAN, Biochem. Biophys. Acta, **451**, 417 (1976).
15. G. DAPERGOLAS, G. GREGORIADIS, Lancet, **ii**, oct. 16, 824 (1976).
16. G. DAPERGOLAS, G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **5**, 1383 (1977).
17. G. DAPERGOLAS, E. D. NEERUNJUN, G. GREGORIADIS, FEBS Lett., **63**, 235 (1976).
18. C. DAVIS, G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **7**, 680 (1979).
19. D. W. DEAMER, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 250 (1978).
20. J. DELATTRE, J. Fr. Biophys. et Méd. Nucl., **1**, 3 (1979).
21. G. DELICONSTANTINOS, G. GREGORIADIS, G. ABEL, M. JONES, D. ROBERTSON, Biochem. Soc. Trans., **5**, 1326 (1977).
22. D. S. DESHMUKH, W. D. BEAR, H. M. WISNIEWSKI, H. BROKERHOFF, Biochem. Biophys. Res. Commun., **82**, 328 (1978).
23. V. DOBRE, Rev. roum. Biochim., **17** 23 (1980).
24. V. DOBRE, C. DUMITRIU, F. CHELU, St. cerc. biochim., **23**, 21 (1980).
25. V. DOBRE, D. MOTAȘ, Rev. roum. Biochim., ,**17** 247 (1980).
26. C. de DUVE, A. TROUET, D. DEPREZ de CAMPENEERE, R. BAURAIN, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 226 (1978).
27. P. M. ELIAS, D. S. FRIEND, J. GOERKE, J. CELL. Biol. **79**, 232 (1978).
28. P. M. ELIAS, J. GOERKE, D. S. FRIEND, J. Cell. Biol., **78**, 577 (1978).
29. J. H. FENDLER, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON John Wiley and Sons, 1980, p. 87.
30. I. J. FIDLER, Science, **208**, 1469 (1980).
31. F. T. FILDES, J. E. OLIVER, J. Pharm. Pharmac., **30**, 337 (1978).
32. D. S. FRIEND, P. M. ELIAS, J. Cell. Biol., **79**, 216 (1978).
33. J. de GIER, M. C. BLOK, P. W. M. van DIJCK, C. MEMBERS, A. J. VERKLEY,, E. C. M. van der NEUT-KOK, L. L. M. van DEENEN, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 85 (1978).
34. J. de GIER, J. G. MANDERSLOOT, L. L. M. van DEENEN, Biochim. Biophys. Acta, **150**, 666 (1968).
35. J. de GIER, J. G. MANDERSLOOT, J. V. HUPKES, R. N. McELHANEY, W. P. van BEEK, Biochim. Biophys. Acta, **233**, 610 (1971).
36. R. M. GOULD, Y. LONDON, Biochim. Biophys. Acta, **290**, 200 (1972).
37. G. GREGORIADIS, FEBS Lett., **36**, 292 (1973).
38. G. GREGORIADIS, în *Enzyme Therapy of Lysosomal Storage Diseases*, sub red. M. TAGER G. J. M. HOOGHWINKEL, W. T. DAEMS, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, Oxford, 1974, p. 131.
39. G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **3**, 613 (1975).
40. G. GREGORIADIS, New Engl. J. Med., **295**, 704 (1976).
41. G. GREGORIADIS, Meth. Enzymol., **44**, 218 (1976).
42. G. GREGORIADIS, Nature, **265**, 407 (1977).
43. G. GREGORIADIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 343 (1978).
44. G. GREGORIADIS, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 25, 329.
45. G. GREGORIADIS, R. A. BUCKLAND, Nature, **244**, 170 (1973).
46. G. GREGORIADIS, G. DAPERGOLAS, E D. NEERUNJUN, Biochem. Soc. Trans., **4**, 256 (1976).
47. G. GREGORIADIS, P. D. LEATHWOOD, B. E. RYMAN, FEBS Lett., **14**, 95 (1971).
48. G. GREGORIADIS, A. MEEHAN, M. M. MAH, Biochem. J., **200**, 203 (1981).
49. G. GREGORIADIS, A. MEEHAN, Biochem., J., **200**, 211 (1981).
50. G. GREGORIADIS, D. E. NEERUNJUN, Biochem. Biophys. Res. Commun., **65**, 537 (1975).

51. G. GREGORIADIS, D PUTMAN, L. LOUIS, D. E. NEERUNJUN, Biochem. J., **140**, 323 (1974).
52. G. GREGORIADIS, B. E. RYMAN, Biochem. J., **129**, 123 (1972).
53. G. GREGORIADES, B. E. RYMAN, Eur. J. Biochem., **24**, 485 (1972).
54. A. HASHIMOTO, J. KAWADA, Endocrinol. Japan., **26**, 337 (1979).
55. W. HOSS, C. SMILEY, J. Neuro. Res., **3**, 249 (1977).
56. C. HUANG, Biochemistry, **8**, 344 (1969).
57. L. HUANG, S. J. KENNEL, Biochemistry, **18**, 1702 (1979).
58. G. M. K. HUMPHRIES, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 345.
59. S. M. JOHNSON, K. W. MILLER, A. D. BANGHAM, Biochem. Biophys. Acta, **307**, 42 (1973).
60. N. O. KAPLAN, V. VENTER, Lucrările Congresului internațional de farmacie, Helsinki, 1976, p. 73.
61. H. K. KIMELBERG, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 219.
62. T. KINOSHITA, K. JNOUE, M. OKADA, Y. AKIYAMA, J. Immunol., **119**, 73 (1977).
63. M. J. KOSLOSKI, F. ROSEN, R. J. MILHOLLAND, D. PADJOPOULOS, Cancer Res., **38**, 2848 (1978).
64. J. T. LEWIS, D. G. HAFEMAN, H. M. McCONNELL, Biochemistry, **19**, 5376 (1980).
65. LIPOPREP, aparat pentru prepararea de lipozomi prin dializă rapidă și controlată DIANORM (Elveția), Wissenschaftliche Instrumente-München (1979).
66. *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980.
67. W. E. MAGEE, O. V. MILLER, Nature, **235**, 339 (1972).
68. W. E. MAGEE, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G GREGORIADIS, A C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 249.
69. E. K. MANESIS, C. H. CAMERON, G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **6**, 925 (1978).
70. E. K. MANESIS, C. H. CAMERON, G. GREGORIADIS, FEBS Lett., **102**, 107 (1979).
71. F. J. MARTIN, R. C. MacDONALD, Nature, **252**, 161 (1974).
72. F. J. MARTIN, R. C. MacDONALD, J. Cell. Biol., **70**, 494 (1976).
73. I. R. McDOUGALL, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980 p. 325.
74. M. H. W. MILSMANN, R. A. SCHWENDENER, H.-G. WEDER, Biochim. Biophys. Acta, **512**, 147 (1978).
75. R. A. MORTARA, F. H. QUINA, H. CHAIMOVICH, Biochem. Biophys. Res. Commun., **81**, 1080 (1978).
76. S. NAKADA, K. INOUE, S. NOJIMA, N. IMURA, Chem.-Biol. Interactions, **22**, 15 (1978).
77. J. A. F. OP den CAMP, J. de GIER, L. L. M. van DEENEN, Biochim. Biophys. Acta, **345**, 253 (1974).
78. R. E. PAGANO, J. N. WEINSTEIN, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 435 (1978).
79. D. PAPADJOPOULOS, E. MATHEW, G. POSTE, R. SMITH, W. J. VAIL, Nature, **252**, 163 (1974).
80. D. PAPADJOPOULOS, N. MILLER, Biochim. Biophys. Acta, **135**, 624 (1967).
81. D. PAPADJOPOULOS, A. PORTIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 50 (1978).
82. D. PAPADJOPOULOS, W. J. VAIL, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 259 (1978).
83. D. PAPADJOPOULOS, C. J. WATKINS, Biochim. Biophys. Acta, **135**, 634 (1967).
84. H. M. PATEL, N. G. L. HARDING, F. LOGUE, C. KEESON, A. C. MacCUISH, J. C. MacKENZIE, B. E. RYMAN, J. SCOBIE, Biochem. Soc. Trans., **6**, 784 (1978).
85. H. M. PATEL, B. E. RYMAN, Biochem., Soc. Trans., **2**, 1014 (1974).
86. H. M. PATEL, B. E. RYMAN, FEBS Lett., **62**, 60 (1976).
87. H. M. PATEL, B. E. RYMAN, Biochem. Soc. Trans., **5**, 1054 (1977).
88. M. PĂTRAȘCU, *Ingineria genetică și modelarea programată a plantelor*, Edit. Ceres, București, 1981 p. 187.
89. G. POSTE, în *Liposomes in Biological System*, sub. red. G. GREGORIADIS, A. C ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 101,
90. F. PUISIEUX, T. T. LONG, A. MOUFTI, Pharm. Acta Helv., **52**, 305 (1977).
91. Y. E. RAHMAN, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red., G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 265,
92. N. van ROOIJEN, R. van NIEUWMEGEN, Immunol. Commun., **9**, 243 (1980).
93. B E. RYMAN, Lucrările Congresului internațional de farmacie, Helsinki, 1976, p. 91.

94. B. E. RYMAN, R. F. JEWKES, K. JEYASINGH, M. P. OSBORNE, H. M. PATEL, V. J. RICHARDSON, M. H. N. TATTERSALL, D. A. TYRRELL, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 281 (1978).
95. B. E. RYMAN, D. A. TYRRELL, în *Liposomes in Biology and Pathology*, vol. 6, J. T. DINGLE, P. J. JAQUES, I. H. SHAW, Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, p 1979 p. 549.
96. G. SCHERPHOF, F. ROERDINK, D. HOEKSTRA, J. ZBOROWSKI, E. WISSE, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G GREGORIADIS, Ac. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 179.
97. R. A. SCHWENDENER, M. ASANGER, H. G. WEDER, Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 1055 (1981).
98. G. SESSA, G. WEISSMAN, J. Biol. Chem., **245**, 3295 (1970).
99. P. SHARMA, D. B. TYRRELL, B. E. RYMAN, Biochem. Soc. Trans., 5, 1146 (1977).
100. I. H. SHAW, J. T. DINGLE, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980 p. 299.
101. I. H. SHAW, C. G. KNIGHT, J. T. DINGLE, Biochem. J., **158**, 473 (1976).
102. J. SUNAMOTO, H. KONDO, A. YOSHIMATSU, Biochim. Biophys. Acta, **510**, 52 (1978)
103. F. SZOKA, D. PAPADJOPOULOS, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. **75**, 4194 (1978).
104. G. TOFFANO, A. LEON, S. MAZZARI, G. SAVOINI, S. TEOLATO, P. ORLANDO, Life Sci., **23**, 1093 (1978).
105. A. TROUET, Eur. J. Cancer, **14**, 105 (1978).
106. D. A. TYRRELL, T. D. HEATH, C. M. COLLEY, B. E. RYMAN, Biochim. Biopys. Acta, **457**, 259 (1976).
107. D. A. TYRRELL, B. E. RYMAN., B. R. KEETON, V. DUBOWITZ, Brit. Med. J., **2**, 88 (1976).
108. K. UEMURA, R. A. NICOLOTTI, H. R. SIX, S. C. KINSKY, Biochemistry, **13**, 1572 (1974).
109. C. VAKIRTZI-LEMONIAS, G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **6**, 1241 (1978).
110. J. E. VOLANAKIS, K. W. A. WIRTZ, Nature, **281**, 155 (1979).
111. G. WEISSMANN, D. BLOOMGARDEN, R. KAPLAN, C. COHEN, S. HOFFSTEIN, T. COLLINS, A. GOTTLIEB, D. NAGLE, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 88 (1975).
112. G. WEISSMANN, A. BRAND, E. C. FRANKLIN, J. Clin. Invest., **53**, 536 (1974).
113. D. WEISSMANN, M. FINKELSTEIN, în *Liposomes in Biological Systems*, sub red. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON, John Wiley and Sons, 1980, p. 153.
114. D. H. WRESCHNER, G. GREGORIADIS, Biochem. Soc. Trans., **6**, 922 (1976).
115. D. H. WRESCHNER, G. GREGORIADIS, D. B. GUNNER, R. R. DOURMASHKIN, Biochem. Soc. Trans., **6**, 930 (1978).
116. D B ZILVERSMIT, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 149 (1978).
117. O. ZUMBUEHL, H. D. WEDER, Biochim. Biophys. Acta, **640**, 252 (1981).

RECENZII

Studies of brain function, vol. 5 : *The oculomotor system of the rabbit and its plasticity* (Studii asupra funcţiei creierului, vol. 5 : Sistemul oculomotor al iepurelui şi plasticitatea sa), H. COLLEWIJN, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 240 p., 128 fig.

Autorul acestei monografii descrie pe larg studiile sale efectuate pe sistemul oculomotor al iepurelui, care este din multe puncte de vedere un model simplificat al sistemului vizual mult mai complex al mamiferelor, cu un grad superior de dezvoltare. Studiul său aduce o contribuţie însemnată în înţelegerea mişcării ochiului la primate, inclusiv la om. Aspectele principale se referă la analizele optochinetice, rflexele vestibulooculare şi interacţiunea lor, la comportarea oculomotorie spontană, la procesul şi căile care selectează orientarea semnalelor vizuale şi relaţia lor cu mişcările vizuale ale ochiului. Au fost elaborate noi tehnici asupra măsurării precise a ochiului şi a mişcărilor capului la animalele ţinute închise, comparativ cu cele care au avut libertate de mişcare.

În „Introducere", problemele abordate se referă la orientarea ochilor, la organizarea retiniană şi la acuitatea vizuală. Capitolul următor tratează despre „Mişcările ochiului în comportarea spontană", în care sînt date tehnicile de măsurare a activităţii spontane, se studiază comparativ mişcările lente şi cele repezi, durata lor şi limitele metodelor utilizate. În capitolul 3, intitulat „Mişcările ochiului în timpul oscilaţiei pasive", se discută despre diferitele tipuri ale reflexelor oculare. Capitolul care se ocupă de „Nistagmus optochinetic şi postrotator" studiază diferite aspecte legate de acest domeniu, cum ar fi : natura reflexului optochinetic, răspunsul opotochinetic la stimularea sinusoidală, reacţii optochinetice în diferite direcţii. Procesul de semnalizare care face obiectul capitolului 5 se referă la căile de informare vizuală prin decelarea mişcării retiniene a selectivităţii de direcţionare (orientare) în nucleul tractului optic şi în sistemul optic posterior. Ultimul capitol al acestei monografii este intitulat „Adaptarea şi limitele ei". În final este dată o bibliografie vastă, ordonată alfabetic, după care urmează un „Supliment", în care este inserat articolul lui J.W.G. ter Baar de la Departamentul de fiziologie al Universităţii din Leyda : „Cercetări asupra optochineticii nistagmusului", articol care constă dintr-un studiu amplu şi amănunţit asupra diverselor manifestări şi forme ale nistagmusului.

Pentru specialiştii care se ocupă de studierea funcţiilor creierului, această monografie constituie un valoros material de studiu.

Corina Mihail

Ocular size and shape. Regulation during development (Mărime şi formă oculară. Reglare în timpul dezvoltării), sub red. S.R. HILFER şi J.B. SHEFFIELD, Springer-Verlag, New York — Heidelberg — Berlin, 1981, 211 p., 80 fig.

Volumul se bazează pe lucrările prezentate la cel de-al V-lea „Simpozion asupra dezvoltării oculare şi vizuale", ţinut la Philadelphia (S.U.A.), în iunie 1980.

Participanţii la simpozion au dedicat acest volum memoriei cercetătoarelor Jane Coulombre şi Beatrice Garber, care au adus o importantă contribuţie la dezvoltarea biologiei, nu numai prin descoperirile lor experimentale, dar şi prin faptul că exemplul lor de pasiune şi dăruire din timpul vieţii şi activităţii ştiinţifice a constituit un model de viaţă şi de muncă pentru toţi cei din jur.

Volumul cuprinde trei domenii principale de preocupări : I. Controlul numărului de celule ; II. Schimbările formei celulare ; III. Fenomene de membrană mediate, care sînt reparti-

zate într-un număr de opt capitole. În final este inclus un capitol special asupra recentelor studii ale terapiei cataractelor, care subliniază strînsa relaţie dintre cercetarea fundamentală şi aplicaţiile clinice.

Primului domeniu îi sînt rezervate două capitole. Cel dintîi tratează despre „Rolul morţii celulei şi al fenomenelor înrudite asupra formării căii optice" ; cel de-al doilea se ocupă de „Mecanismul de determinare a formei celulei în conurile retiniene la teleosteeni".

Următoarele capitole conţin studiile incluse în cel de-al doilea domeniu de preocupări. În capitolul 3, intitulat „Schimbări intra- şi extracelulare în timpul dezvoltării oculare timpurii la embrionii de pui", se face un studiu amplu, însoţit de un bogat material ilustrativ, în care se expun aspectele cercetate, şi anume: iniţierea stadiului optic primar, invaginaţia discului retinian, implicarea procesului contractil, schimbări la suprafaţa celulei apicale. Capitolul 4 tratează despre „Mecanismul de alungire a celulei în timpul diferenţierii fibrei celulare a cristalinului". S-a considerat necesară studierea a două aspecte de o deosebită importanţă în procesul de dezoltare a cristalinului, şi anume stimularea unei celule epiteliale a cristalinului pentru a deveni o fibră celulară, stabilizînd şi menţinînd astfel polaritatea cristalinului şi, respectiv, procesul prin care această celulă stimulată se alungeşte pentru a forma fibra celulară a cristalinului. Capitolul următor se ocupă de „Diferenţierea suprafeţei celulare în retina embrionară de pui". În acest capitol se insistă asupra studiilor relevante pentru faza de constituire a straturilor celulare, folosindu-se tehnici morfologice (culturi de celule, tehnici de marcare a celulei) şi biochimice (electroforeza în gel de poliacrilamidă a polipeptidelor de pe suprafaţă a diferitelor populaţii de celule).

De cel de-al treilea domeniu de preocupări, care se referă la fenomene de membrană mediate, se ocupă ultimele trei capitole. Primul dintre ele este intitulat „Aderenţa intracelulară dintre celulele retiniene în dezvoltare: rolul ligantinei ca element fundamental". Rezultatele obţinute au dus la concluzia că ligantina este o proteină plasmatică de membrană sau o familie de proteine răspîndită într-o largă varietate de ţesuturi printre vertebrate. Ea pare să fie asociată cu alte proteine care ajută la determinarea interacţiunilor, fie cu alte celule învecinate, fie cu mediul biochimic înconjurător. Următorul capitol studiază „Gradientul topografic al moleculelor din membrana celulară în retina neurală aviară decelat prin anticorpi monoclonali". Se descrie un studiu amplu şi laborios de obţinere a anticorpilor monoclonali. În această lucrare, şoarecii au fost imunizaţi cu celule din diferite porţiuni de retină pentru a obţine linii de celule hibridoame, care sintetizează anticorpi cu specificitate topografică în retină. Specificitatea anticorpilor faţă de celulele hibridoame a fost evaluată prin determinarea concentraţiei antigenului localizat strict în zona de retină folosită pentru imunizare, faţă de concentraţia lui din oricare altă zonă din retină. Se descrie un hibridom care se leagă de un antigen celular de suprafaţă, într-un gradient topografic. Ultimul capitol din acest domeniu se ocupă de „Maturarea fibrei celulare a cristalinului: unele corelaţii morfologice şi biochimice".

Volumul se încheie cu un capitol referitor la „Date recente în terapia cataractelor".

Fiecare din capitolele amintite conţine un bogat material bibliografic.

Corina Mihail

Current topics in microbiology and immunology (Probleme în microbiologie şi imunologie), vol. 91, sub red. Henle W., Hofschneider P. H., Koldovsky, P., Koprowski H., Maaloe O., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 284 p., 70 fig.

Acest volum cuprinde opt articole, iar la sfîrşitul fiecărui articol se prezintă o bogată bibliografie.

Primul articol relatează date cu privire la studiile genetice asupra reovirusului, ajungîndu-se la concluzia că serotipurile reovirusului mamiferelor s-au dovedit a fi un sistem genetic model pentru virologia animală.

În articolul următor se vorbeşte despre proteina care se transformă din virusul sarcomului aviar (VSA) şi homologul ei în celulele normale. S-a pus în evidenţă din punct de vedere genetic că o singură genă VSA Src, este necesară pentru transformarea celulelor în cultură la fel de bine ca şi pentru formarea tumorilor. Este totuşi mai puţin sigur dacă expresia acestei gene singură este suficientă pentru transformare sau ea este însoţită de alte componente. Fără îndoială că studiul produsului genei Src oferă unul dintre cele mai bune sisteme cu privire la evenimentele biochimice în celula transformată. Produsul Src al genei VSA este o fosfoproteină de 60 000 daltoni şi un homolog asemănător s-a găsit în celulele normale de la păsări

și de la mamifere. Se caracterizează cele două proteine atît din punctul de vedere al structurii lor, cît și cu privire la zonele specifice celulare de acțiune.

Implicarea utilizării reactivilor specifici hibridizării, care ar putea fi preparați prin transcripția reversă a ARN retroviral aviar, și apoi selectarea prin hibridizarea lor, fie pozitivi, fie negativi, pentru a defini regiunile genetice ale genomului sînt studiate și relatate în articolul al treilea.

În articolul al patrulea se vorbește despre replicarea ADN-ului virusului herpetic.

Un rezumat cu date recente asupra tiroiditei spontane autoimune la găinile de linie pură Obese (OS) este relatat în articolul al cincilea. Autorul arată că OS este departe de a servi ca model unic pentru tiroidita autoimună, care se aseamănă cu boala lui Hashimoto de la oameni în cele mai multe aspecte, dar se pare că poate fi un instrument ideal pentru elucidarea manipulării în cunoașterea mecanismelor efectorului și supresorului în acest grup de boli. Autorii speră ca acest rezumat să stimuleze ca în cercetările viitoare să se utilizeze această linie pură de găini.

În articolul al șaselea sînt sumarizate date din literatură cu privire la structura peptidelor și biosinteza lor, formarea legăturilor peptidice, structuri multienzimatice, degradarea *in vitro*, proteoliza limitată, schimbări mutaționale ale structurilor enzimatice, funcțiunile de reglare ale peptidelor microbiene.

În articolul al șaptelea se relatează o serie de probleme cu privire la receptorul celulei T.

În ultimul articol se vorbește despre expresia retrovirală a genei. Se arată că descoperirea reverstranscriptazei a constituit un stimul major pentru studiul metabolismuluire, trovirusului. Datele din această lucrare sînt concentrate asupra sintezei modificării posttranscripționale și translației RNA_S retroviral, asupra factorilor celulari și virali care influențează expresia genei virale, precum și asupra unor efecte ale expresiei genei virale la celulele infectate.

Această carte, cu o documentație foarte bogată, adusă la zi, este de un real folos medicilor, imunologilor, biochimiștilor, virusologilor și în special tuturor celor care lucrează în domeniul problemelor de genetică.

Lucia Buzilă

H. F. STICK, R. H. C. SAN, *Topics in Environmental Physiology and Medicine. Short tests for Chemical Carcinogens* (Probleme curente în fiziologie și medicina mediului înconjurător. Teste rapide pentru substanțele chimice cangerigene), sub red. KARL E. SCHAEFER, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 518 p., 160 fig.

Recentul curent de interes în desemnarea și punerea în aplicare a testelor rapide pentru substanțele cangerigene a dus la corelația convingătoare dintre cancerogeneză și mutageneză a agenților fizici și chimici și la presupunerea că alterările ADN, mutațiile și aberațiile cromozomiale sînt oarecum implicate în transformările neoplazice. Avînd în vedere avansarea rapidă în ceea ce privește detectarea substanțelor chimice cu proprietăți cancerigene și mutagene din mediul ambiant, se pare că s-a ajuns la o răscruce. S-a găsit necesar acum să se stabilească noile priorități pentru cercetările viitoare și trebuie făcută o evaluare netendențioasă a hazardului actual cu privire la compușii pentru populația umană.

În acest scop au fost invitați 43 de experți, care au prezentat lucrări pentru a stabili utilizarea testelor rapide de detectare a genotoxinelor și implicarea potențialului canceros al substanțelor chimice simple, precum și al amestecurilor complexe ale compușilor ce se găsesc în mediul înconjurător. A devenit foarte evident că nu se poate spune ceva concret despre toți agenții genotoxici doar cu o bioîncercare. De aceea, această carte conține un spectru de teste care utilizează o varietate largă de organisme pentru stabilirea genotoxicității.

În primele trei lucrări este discutată posibilitatea utilizării testelor virale. În trecut, virusurile cu genomii lor bine cunoscuți și ușurința de mînuire nu au primit atenția cuvenită. Șapte lucrări discută metodele bazate pe interacțiunea agenților genotoxici și cancerogi cu ADN-ul celulelor țintă. Rezultatele descoperirii cu privire la testele microbiene utilizate pentru mutagenicitate s-au relatat în alte șapte lucrări. Doar într-o singură lucrare sînt utilizate plantele superioare (*Tradescanția*) în acest scop.

Aberațiile cromozomiale, testul micronucleului și automatizarea alterărilor citogenice sînt relatate în următoarele cinci lucrări. Anomaliile cromozomilor complementari erau găsite într-o frecvență mai mare printre anomaliile congenitale, nașterea unui copil mort, și tumorile spontane sau induse. Aceste anomalii cromozomiale pot să reprezinte un vîrf care pare să fie o parte integrantă a diferitelor dezordini genetice ce afectează populația umană.

Cel mai important aspect al testelor la mamifere este utilizarea culturilor de celule umane. S-au utilizat celule umane de la indivizi predispuși la cancer, care au răspuns diferit față de substanțe cancerigene sau mutagene în interiorul grupelor de populație. Faptul că diferite încercări mai dezvoltate *in vivo* încorporează avantajele testelor rapide *in vitro* cu completarea biodeterminărilor utilizînd animalul în întregime este relatat în patru lucrări.

Ultimele patru lucrări sînt dedicate discuției determinărilor cantitative ale mutagenezei, problemei aplicării testelor rapide și unor lucrări nerezolvate.

Această carte poate fi de ajutor tuturor medicilor, biochimiștilor, chimiștilor și biologilor care lucrează în acest domeniu, precum și acelora care trebuie să aleagă sistemul testelor pentru a le da posibilitatea să ia decizii regulamentare cu privire la mediul înconjurător.

Lucia Buzilă

Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach (Oxigenul și procesele vieții. O abordare interdisciplinară), în *Topics in Environmental Physiology and Medicine* (Aspecte în fiziologia și medicina mediului), sub red. E. SCHAEFER, ed. by. D.L. GILBERT, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 105 fig., 401 p.

Volumul cuprinde istoricul oxigenului, prezența acestuia în univers, biochimia oxigenului și utilizările clinice. conținînd idei noi în domeniu.

Cartea se adresează unei game întinse de specialiști, istorici, astronomi, geochimiști, evoluționiști, biochimiști, fiziologi, patologi și clinicieni; în același timp, prin stilul de abordare a problemelor, ea poate fi studiată și de către studenți (viitorii specialiști în domeniile respective) sau de către orice persoană care dorește să își îmbogățească cunoștințele despre oxigen.

Lucrarea este împărțită în patru părți; prima parte cuprinde o introducere pentru înțelegerea următoarelor două părți, iar ultima parte integrează articole cuprinzînd perspectivele generale ale oxigenului în lumea vie.

Partea I plasează oxigenul într-un context istoric; sînt puse în evidență idei originale, cum ar fi „teoria radicalului liber" în strînsă legătură cu acțiunea oxigenului în sistemele biologice.

În continuare sînt prezentate chimia diferitelor forme reactive ale oxigenului în univers și pe pămînt, precum și circuitul oxigenului în natură.

Partea a II-a tratează mecanismul producerii oxigenului prin fotosinteză. De asemenea, cititorul face cunoștință cu efectele negative ale oxigenului asupra organismelor unicelulare și cu mecanismele de transport ale oxigenului în țesuturile organismelor multicelulare.

Partea a III-a se ocupă cu importanța clinică și practică a oxigenului. Întrucît plămînul este organul expus la cea mai mare cantitate de oxigen, sînt discutate efectele negative ale oxigenului în plămîni.

Ultimele capitole din această secțiune se ocupă cu utilizarea clinică a oxigenului și urmările negative în cazul unui exces de oxigenoterapie la copiii prematuri.

Partea a IV-a integrează lucrările în legătură cu oxigenul din organismele vii.

Cititorul întîlnește în capitolele parcurse tema dualismului oxigenului. Oxigenul produce energia necesară vieții pe pămînt, dar totodată poate distruge viața.

Viața aerobă reprezintă o balanță între aceste forțe opuse, în sensul menținerii funcționării optime a sistemului biologic.

Autorii sînt personalități cunoscute în diferite domenii, de la microcosmos la macrocosmos, lucrările lor avînd o contribuție însemnată pentru înțelegerea însemnătății acestui gaz pentru organismele vii.

Eugenia Pandele

Metabolism and Molecular Activities of Citokinins (Metabolismul și activitățile moleculare ale citochininelor). Proceedings of the International Colloquim of the Centre National de la Recherche Scientifique, held at Gif sur Yvette, France, 2—6 September 1980, ed. by J. GUERN, C. PÉAUD-LENOËL, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg — New York, 1981, 352 p., 70 fig.

Volumul de față a apărut cu ocazia colocviului organizat de Centrul național de cercetări științifice și Institutul național de cercetări agronomice din Franța în legătură cu metabolismul plantelor și activitatea citokininelor la nivel molecular.

Scopul principal al acestui colocviu a fost de a întruni un număr de oameni de știință care să poată aduce contribuții importante în rezolvarea problemelor de citochimie, precum și elucidarea biosintezei citokininelor naturale.

Volumul cuprinde șase secțiuni importante, care tratează, respectiv, biosinteza citokininelor, metabolismul și rolul fiziologic în plante sau bacterii, hormoni receptivi cu citokinină, citokininele în sinteza proteinelor și metabolismul ARN-ului, citokininele și formarea cloroplastelor, sistemul animal răspunzător asupra citokininelor sau analogi ai citokininelor.

S-a constatat că la o serie de plante bacteriile plasmidice, simbiotice sau parazite înzestrează planta-gazdă cu o mare cantitate de citokinine, precum și cu alți factori de creștere.

Acțiunea citokininelor este interesantă nu numai pentru fiziologia plantelor, dar și pentru microbiologie, precum și pentru cercetările din domeniul biochimiei animale.

Citokininele au fost studiate cu explicarea activității lor ca factori de diviziune a celulelor plantelor, fiind integrate în clasa hormonilor vegetali.

De un interes deosebit s-a bucurat studiul derivaților activi primari metabolici ai citokininelor, cum ar fi bazele libere, nucleozidele și nucleotidele precum și cîteva complexe specifice: citokinina-receptor.

Pe parcursul cîtorva capitole, cititorul poate afla o serie de date și comentarii cu privire la mecanismul activității hormonale.

În stadiul actual de cercetare se cunosc două ipoteze alternative; 1) citokininele stimulează în mare mecanismul de sinteză a proteinelor, probabil la nivelul transcripției; 2) citokininele stimulează mecanisme biosintetice specifice, determinînd transformări selective în echipamentul macromolecular al celulelor.

Va fi interesant de urmărit ce răspunsuri vor fi date pe viitor pentru progresul rapid în acest domeniu.

Eugenia Pandele

Elecktronen-mikroscopische Laboratorpraxis (Manual de laborator pentru microscopia electronică), ed. by WALTER NAGE, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 143 p.

Lucrarea reprezintă o carte de lucru care, într-o formă concentrată, la obiect, tratează o gamă largă a tehnicilor curente de preparare a specimenelor biologice destinate vizionării la microscopul electronic de transmisie. În plus, în ultimul capitol se descriu pe scurt tehnica microscopiei electronice în baleiaj (al cărei punct foarte este prezentarea aparatului de „critical point") și tehnica analizei prin raze X a elementelor chimice la nivelul celular (EDAX).

Primul capitol tratează problemele teoretice ale fixării și includerii materialului biologic și face o succintă trecere în revistă a principiilor microscopului în transmisie.

Se dă schema coloanei microscopului electronic ZEISS EM-10.

Al doilea capitol, cel mai important, realizează și scopul lucrării: metode practice în prepararea specimenelor biologice. Astfel, se abordează: tehnica fixării cu rețetele fixatorilor uzuali (tetraoxidul de osmiu, glutaraldehida, formaldehida, permanganatul de potasiu), rețetele tamponului fosfat și cacodilat, rețeta amestecului de fixatori: tehnica includerii în cele mai bune medii: Spurr; amestec de Epon 812 și araldită M; mikropal; tehnica realizării și depunerii membranei de formvar pe grile electrolitice.

Tratarea tehnicilor nu este exhaustivă, ci selectivă; cele mai bune tehnici sînt prezentate suficient de amănunțit, încît să poată fi aplicate cu ușurință de către experimentator. Spre exemplu, nu s-a tratat membrana de colodiu, fiind mai puțin rezistentă; de asemenea, nu s-au abordat o serie de incluzionanți, cum ar fi araldita, datorită calităților mai slabe ale imaginilor obținute pe secțiuni din specimene biologice dure sau dispersate (culturi celulare). În schimb, în cazul Spurr-ului se dau rețetele de includere pentru durități diferite. În paragrafele privind ultramicrotomia se abordează numai problemele cheie: fabricarea cuțitelor, rolul unghiurilor tăierii și ale cuțitului. După tratarea problemelor colorării secțiunilor, autorul abordează tehnici speciale ale ultrasecțiunilor: ultracitohistochimia și autoradiografia. Se dau rețetele respective și modul de folosire. În paragrafele speciale se tratează laborios tehnicile Kleinschmidt și Miller de izolare a ADN din nucleul celulei, precum și tehnicile de metalizare și colorare negativă a ADN depus pe membrană. La finele capitolului, autorul abordează detaliile metodei criodecapajului („freeze-etching").

În capitolul al treilea se face o trecere în revistă a condițiilor ce trebuie îndeplinite în reglajul microscopului electronic pentru a avea imaginea optimă. În speță se tratează problemele

focalizării imaginii, a astigmatismului și a măririi. De asemenea, se analizează tipurile de artefacte pe imaginea electronooptică a secțiunilor și cauzele acestor artefacte.

În anexă, cartea posedă o bibliografie bogată, o listă cu furnizorii principalelor materiale necesare lucrărilor, un atlas cu imagini de secțiuni ultrafine, care ilustrează metodele prezentate.

Corneliu Dimitriu

Current topics in microbiology and immunology, vol. 93 ; *Initiation signals in viral gene expression* (Semnale de inițiere în expresia genelor virale), ed. by A. J. SHATKIN, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 30 fig., 6 tab., 218 p.

Volumul de față se referă la ultimele date în legătură cu genetica virusurilor animale. Aspectele prezentate se referă la elucidarea mecanismelor de acțiune a genelor virale și, prin intermediul acestora, se lămurește expresia genelor la eucariote.

La virusul SV_{40}, reglarea transcrierii genelor se realizează prin intermediul unei molecule proteice, antigenul T, care a fost purificat, căruia i s-a determinat și greutatea moleculară și care apare ca o proteină virală timpurie imediat după infecția celulelor-gazdă.

Un alt capitol se referă la regiunile de control ale transcrierii genelor, punîndu-se în principal accentul pe rolul ARN-polimerazelor II și III, precum și pe modul lor de acțiune, cerința acestora de a exista o anumită secvență nucleotidică pentru inițierea acțiunii de transcriere cu ajutorul acestor ARN-polimeraze.

Segmentarea ARN-m după ce acesta a fost sintetizat, precum și reglarea expresiei genelor pe care acesta le transcrie constituie o altă problemă dezbătură pe larg.

O problemă deosebit de importantă este cea care lămurește modul de recunoaștere a ARN-m viral de către ribozomii eucariotelor în timpul inițierii sintezei proteice. Există situsuri de inițiere specifice pentru începerea sintezei proteice ce pot fi recunoscute de ribozomi și în principal existența codonului inițial AUG, deși mai există excepții de la această regulă.

O altă problemă lămurită este aceea a necesității existenței unor primeri pentru a se realiza transcrierea ARN viral și acesta poate fi și un ARN heterolog, adică provenit din altă sursă. Se lămurește pe larg modul de transcriere ARN al virusului influența.

Particulele defective care interferă în sinteza virusurilor ARN sînt o chestiune pe larg dezbătură în carte.

Prin lămurirea acestor aspecte moleculare multiple ale funcționării materialului genetic viral se aduce o contribuție importantă la cunoașterea mecanismului respectiv cu implicațiile pe care le poate avea în cunoașterea mecanismului de acțiune a genomului eucariotelor.

Volumul constituie un îndrumar prețios pentru cei ce se ocupă de genetica virusurilor animale și de interdependența virus-celulă-gazdă.

Ion Vătafu

Neirofiziologhiceskie mehanizmi epilipsii (Mecanismele neuro-fiziologice ale epilepsiei), Metzniereba, Tbilisi, 1980, 260 p.

Volumul conține textul integral al lucrărilor prezentate la primul simpozion — cu participare internațională — asupra mecanismelor neurofiziologice ale epilepsiei, care a avut loc la Tbilisi, în octombrie 1978.

Problema epilepsiei prezintă un deosebit interes pentru neurofiziologi. Pe de o parte, fenomenele epileptice condiționate de particularitățile activității formațiunilor neuronice ale scoarței cerebrale pot fi înțelese numai prin luarea în considerare a legităților neurofiziologice și prin folosirea unor metode de investigație adecvate ; pe de altă parte, cercetarea accesului epileptic poate oferi multe amănunte pentru înțelegerea mecanismului activității întregului creier, întrucît descrierea epileptică reprezintă în felul său un experiment neurofiziologic natural, care relevă localizarea funcțiilor în creier.

Din cele 25 de lucrări prezentate, o parte se ocupă cu mecanismele celulare și sinaptice ale apariției, generalizării și încetării activității epileptice din creier. Cîteva comunicări sînt consacrate interrelațiilor dintre activitatea epileptică și diferite faze ale ciclului veghe-somn.

Cartea prezintă interes atît pentru clinicieni-neurologi, cît și pentru fiziologi, biofizicieni și biologi.

H. Țițu

I.K. SVANIDZE, E.V. DIDIMOVA, *Nekotorîie aspekti kultivirovania nervnoi tkani* (Unele aspecte ale culturii țesutului nervos), Metzniereba, Tbilisi, 1981, 146 p.

Monografia se ocupă cu caracteristicile modificărilor celulelor nervoase și gliale în condițiile culturii de țesuturi. O mare atenție este acordată problemelor de identificare și diferențierii structurale și citochimice a celulelor cultivate. Se tratează diferite aspecte ale diferențierii neuronilor, inclusiv dezvoltarea sistemului primordiilor, activitatea lor motoare, mielinizația, stabilirea contactelor sinaptice, activitatea specifică a celulelor. Sînt expuse datele care confirmă posibilitatea dezvoltării celulelor nervoase în cultură analog condițiilor *in vivo*. Se analizează interrelațiile dintre neuroni și celulele gliale. O atenție deosebită se acordă analizei modificărilor ritmice ale greutății uscate a celulelor gliale și importanței contactelor intercelulare în sincronizarea acestor oscilații. Se compară reactivitatea celulelor gliale, plasticitatea lor în condițiile regenerării reparatoare și culturii de țesuturi. În capitolul consacrat cultivării celulelor izolate — nervoase și gliale — după disocierea țesutului nervos, sînt expuse problemele agregării celulelor și procesele care conduc la refacerea structurii organului disociat.

H. Tiția

HARTWIG WOLBURG, *Axonal transport, degeneration, and regeneration in the visual system of the goldfish* (Transportul axonal, degenerarea și regenerarea sistemului vizual la crapul auriu), în *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol. 67, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 94 p., 28 fig.

Volumul de față reprezintă rezultatul unei cercetări științifice concrete în vederea precizării, la *Carassius auratus*, a fenomenelor binecunoscute la mamifere privind transportul axonal, degenerarea walleriană și regenerarea nervului.

După o scurtă introducere, în care se prezintă principalele rezultate din literatura ultimului deceniu, autorul descrie, în capitolul de material și metode, dimensiunile și proveniența peștilor, substanțele și modul de injectare intraoculară, măsurătorile prin scintilație lichidă a probelor de țesut vizual, cultivarea „in vitro" a sistemului vizual și operația de lezare retrooculară a nervului optic. În același capitol se prezintă tehnicile de ultrastructură. care debutează cu disecția fină sub stereomicroscop, fixarea în glutaraldehidă și acid osmic, colorația totală cu uranilacetat. Secțiunile semifine și fine au fost colorate după tehnici de rutină.

Capitolul de rezultate cuprinde studiul retinei, al nervului și tractusului optic, precum și al tectumului optic la pești normali. Studiul transportului axonal s-a realizat prin urmărirea distribuției unor substanțe ca uridina-H^3 și prolina-H^3 de la ochi la tectum optic, prin măsurarea radioactivității.

Degenerarea walleriană a fost studiată după lezarea prin zdrobire a unei zone înguste a nervului optic. S-au înregistrat la nivel ultrastructural schimbările care intervin în retină și în fibrele optice, cu sau fără injecții de ouabaină.

Regenerarea sistemului vizual a fost cercetată timp de 85 de zile de la degenerarea realizată prin tehnicile de mai sus. Regenerarea unor părți ale sistemului vizual este un fapt cert : multe fibre nervoase sînt mielinizate, astroglia este refăcută în forma și funcțiile normale. După distrugerea completă a retinei, regenerarea retinală este întîrziată și incompletă în aria centrală.

În capitolul de discuții, datele originale sînt puse în acord cu datele de literatură.

Volumul se încheie cu un vast capitol de bibliografie și cu un index pe subiecte. Ilustrația, reprezentată mai ales prin fotografii electronooptice de ansamblu, oferă un bun suport faptic acestei frumoase cercetări.

Cartea se adresează atît cercetătorilor din domeniul biologiei celulare interesați în mecanismele de transport la nivelul membranei sau în procesele de degenerare și regenerare neuronală, cît și specialiștilor în fiziologia comparată a vederii.

C.-C. Prunescu

YA. V. BELIK, *Neirohimia, bibliograficeskii ukazatel 1953—1962* (Neurochimia, Indicator bibliografic), Naukova Dumka, Kiev, 1979, 404 p.

Progresele înregistrate în studiul funcționalității celulei nervoase și a sistemului nervos în general sînt dintre cele mai fascinante, iar acest gen de cercetări prezintă un caracter prioritar în biologia modernă. Pentru obținerea de rezultate valoroase, un rol decisiv îl au folosirea unor tehnici de investigație sofisticate și o documentare asiduă în legătură cu tot ce s-a realizat pînă în prezent, în întîmpinarea ultimului deziderat vine și cartea profesorului Ya. V. Belik, care și-a asumat misiunea, deloc facilă, de a elabora un indicator cu lucrările publicate în domeniul neurochimiei.

Indicatorul cuprinde în prima parte titlurile a 5650 de lucrări experimentale, sinteze și monografii, grupate pe ani, privind biochimia sistemului nervos, efectuate de circa 6 000 de specialiști, publicate în 25 de limbi în perioada 1953—1962. Constatăm cu satisfacție că în volumul respectiv figurează și numeroase lucrări efectuate de 80 de cercetători din țara noastră. Fiecare descriere bibliografică se termină cu informații privitoare la limba în care au apărut lucrările originale și rezumatul lor. Se face de asemenea trimiterea la „Referativnîi Jurnal", în care acestea au fost recenzate.

Cartea mai conține două indexuri ajutătoare: indexul de termeni, constînd din 1 300 de cuvinte cheie, și indexul autorilor. Cu ajutorul acestor indexuri, cititorul poate să găsească rapid lucrarea care îl interesează.

În încheiere, considerăm ca binevenită și utilă contribuția menționată și credem că autorul ei este preocupat în continuare de editarea unui volum care să cuprindă indicațiile bibliografice pînă în prezent, oferindu-ne astfel posibilitatea obținerii de informații cît mai recente în domeniul neurochimiei.

H. Țițu

A.B. BORLE, Z.S. AGUS, M. E. SCHLAEFKE, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Aspecte ale fiziologiei, biochimiei și farmacologiei), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 284 p.

Volumul conține patru articole, și anume: 1) un necrolog al lui Feodor Lynen; 2) un articol referitor la controlul, modularea și reglarea calciului celular; 3) un altul referitor la transportul calciului în rinichi și, în sfîrșit 4) un foarte interesant articol referitor la controlul central al chemosensibilității, Se încheie cu un index de autori și un index de subiecte.

1. Feodor Lynen s-a născut în 1911 și a murit la 6 august 1979, în urma unor complicații survenite după o intervenție chirurgicală. El a fost unul din cei mai străluciți biochimiști ai vremurilor noastre.

Numele său este strîns legat de biochimia produșilor intermediari ai metabolismului și a mecanismelor reacțiilor enzimatice, de descoperirea acetil coenzimei A , a acidului carbonic activat, a izoprenului reactiv și a multor altor descoperiri importante. Laureat al Premiului Nobel pentru fiziologie și medicină în anul 1964, alături de Konrad Block, marele biochimist Feodor Lynen s-a bucurat în timpul vieții sale de recunoașterea internațională a geniului său, prin acordarea de numeroase alte premii și funcții de răspundere în cercetarea științifică.

Ca om de știință, și-a desfășurat activitatea acordînd o mare importanță atît experimentului, cît și ipotezelor științifice, care constituiau întotdeauna punctul de pornire al cercetărilor sale. În procesul de creație științifică, Feodor Lynen avea darul de a filtra și combina bogatele și profundele sale cunoștințe din domeniul biochimiei și biologiei, reușind să scoată la iveală interconexiuni ascunse ale fenomenelor.

Iată o interesantă idee exprimată de marele biochimist și care ne poate servi ca o lecție în cercetarea științifică. „Fii naiv și încearcă să experimentezi chiar și atunci cînd perspectivele par slabe în privința rezultatelor. Am impresia că mulți din colegii mei biochimiști—și acestora poate să le fie valabil și pentru alte științe — își pierd mai mult timp pentru discutarea argumentelor „pro" și „contra" unui experiment decît ar fi necesar să efectueze acest experiment. Cred că multe ocazii de a face noi descoperiri se pierd în felul acesta. Natura e mereu imprevizibilă și unica metodă de a rezolva o problemă de biochimie este aceea de a experimenta".

2. Importanța metabolismului calciului în funcția celulară e bine cunoscută. În majoritatea proceselor în care intervine calciul: contracția, secreția, activarea enzimatică, reglarea metabolismului, creșterea, mobilitatea și transportul ionic, el acționează ca un transportor de semnal.

Informațiile strînse în lucrarea prezentată dovedesc că distribuția calciului între diferitele compartimente subcelulare este foarte asemănătoare în toate celulele și la majoritatea speciilor. O excepție de la această regulă o fac eritrocitele. Mărimea fluxului de calciu prin plasmalemă nu diferă foarte mult de la o celulă la alta, deși mecanismele prin care se realizează acest proces variază foarte mult. Există însă o mare diferență între transportul calciului mitocondrial; numărul de mitocondrii pe celulă și afinitatea lor pentru calciu poate varia foarte mult (în diferite formațiuni), dar viteza maximă a transportului este aproximativ aceeași. Cea mai mare diferență există între consumul de calciu de către reticulul sarcoplasmatic al mușchilor scheletali și transportul calciului de către reticulul endoplasmatic al altor celule; deși afinitatea pentru calciu în aceste formațiuni poate fi similară, viteza maximă a proceselor diferă cu 2—3 ordine de mărime. Aceasta poate avea consecințe importante cînd se apreciază rolul fiecărui proces de transport (plasmalemele, mitocondrial etc.) în controlul calciului citosolic liber.

3. Calciul e reabsorbit în majoritatea segmentelor nefronului mamiferelor pe o cale în general similară cu cea a reabsorbției sodiului. Se analizează reabsorbția calciului pe diferite porțiuni ale nefronului prezentîndu-se și factorii care influențează transportul său.

4. Concentrația ionilor de hidrogen din lichidul extracelular al creierului este necesar să fie precis controlat, pentru a asigura condițiile funcționale de bază ale sistemului nervos central. Acest rol este îndeplinit atît de un sistem de tamponare al creierului, cît și de cooperarea dintre mecanismele periferice și centrale de chemosensibilitate, care influențează sistemul respirator printr-un „input" aferent mai mult sau mai puțin accentuat.

Studiile asupra factorilor care asigură chemosensibilitatea au arătat că este vorba de structuri morfologice distincte de populațiile de neuroni cu rol în respirație, constînd din formațiuni cu rol în reglarea conținutului mediului celulelor creierului. Lucrarea e ilustrată cu numeroase fotografii la microscopul electronic.

Margareta Dumitrescu

Aufgaben und Rationalisierung der Klinischen Biochemie (Sarcini și raționalizare în biochima clinică), Herausgegeben von MR Dr. rer. nat. Dr. sc. med. H.-J. Thiele, Prof. Dr. sc. med. D. W. Scheuch, VEB-Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981, 256 p.

Lucrarea este o monografie care conține indicații valoroase pentru utilizarea optimă de către medici din clinică a datelor de laborator, precum și numeroase sugestii pentru raționalizarea muncii biochimiștilor.

În ultimul deceniu, aspectele biochimice ale fenomenelor patologice au cîștigat un rol foarte important în diagnostic (în diagnosticul precoce în special) și în controlul efectelor terapiei.

Introducerea unor parametri noi și a unor metode, precum și creșterea cercetărilor din acest domeniu au dus la o eficiență crescută a diagnosticului de laborator.

În afară de metodele de analiză a proteinelor, lipidelor, hormonilor și a analizelor hematologice, acest accent deosebit este pus pe metodele analitice de toxicologie. Rapiditatea testelor, necesară în special în cazurile de urgență (realizate și prin metoda chiturilor), este de asemenea pusă în discuție.

Datele statistice asupra morbidității arată că în epoca modernă bolile cu incidența cea mai crescută sînt cancerul și bolile cardiovasculare. În cadrul metodelor de analiză a proteinelor, un aspect deosebit de interesant este cel ce se ocupă de metodele de analiză a proteinelor tumorale: α-fetoproteine, antigeni carcinoembrionali. Se arată că pentru diagnosticarea bolilor aterosclerotice un parametru foarte esențial este constituit de raportul:

$$\text{acid uric} \times \frac{\text{colesterol}}{\text{fosfolipide}}$$

În ceea ce privește organizarea se pornește de la premisa că este necesară raționalizarea tuturor proceselor de muncă din laborator.

În următorii cîțiva ani productivitatea muncii va crește cu aproximativ 300%, ceea ce va permite implicit o îmbunătățire a calității muncii analitice.

Deosebit de interesant este, de asemenea, punctul de vedere că diagnosticul de laborator trebuie să fie o acțiune interdisciplinară în care se angajează medicii curanți și asistenții medicali, muncitorii angajați în sistemul de transport, diagnosticienii de laborator, analiștii, specialiștii în documentare, ca și consilierii din diferite alte discipline.

Margareta Dumitrescu

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 25. Wood, Leather and some Associated Industries (Monografii ale IARC de evaluare a riscului carcinogenic al substanțelor chimice asupra organismelor umane. Vol. 25. Industria lemnului, industria pielăriei și unele industrii asociate), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1981, 412 p., 7 fig., 58 tab.

De vreo zece ani Agenția Internațională pentru cercetarea cancerului se ocupă cu evaluarea riscului carcinogenic al diverselor substanțe chimice asupra omului, înțelegînd prin această noțiune probabilitatea ca expunerea la diverse substanțe chimice să conducă la apariția neoplasmelor la om.

Rezultatele studiilor efectuate au fost publicate într-o serie de 24 de volume, prezentul volum fiind cel de-al 25-lea.

Din 1980 programul de cercetare al IARC s-a extins și asupra evaluării riscului de apariție a cancerului la oamenii care lucrează în diverse industrii.

Datele publicate în prezentul volum reprezintă studiile și punctele de vedere asupra riscului de apariție a cancerului la cei ce lucrează în industria lemnului, a pielăriei sau în industriile asociate, ale unui grup de experți în problemă, care s-au întîlnit la Lyon în perioada 3—10 iunie 1980.

Prezentul volum a fost scris ca urmare a faptului că din 1965 s-a raportat un număr neobișnuit de mare de cazuri de cancer nazal apărut la lucrătorii din industriile menționate, ceea ce presupune prezența unor materiale carcinogenice în mediul înconjurător al acestor meserii.

Studierea substanțelor posibil nocive cu care se lucrează a evidențiat faptul că multe sînt comune acestor industrii.

Praful produs de materialele naturale cu care se lucrează sugerează, de asemenea, o similitudine în etiologia maladiilor provocate.

S-a observat că și situsurile de instalare a tumorilor sînt comune, s-a constatat o incidență mai mare a cazurilor de cancer al aparatului respirator, dar și o apariție de cazuri de cancer hematopoetic și limforeticular. Monografia cuprinde o clasificare a diverselor ramuri din cadrul industriei lemnului sau pielăriei și pentru fiecare ramură sînt expuse cîteva date istorice privind apariția și dezvoltarea în timp, procesele tehnologice, modul de distribuție a lucrărilor în funcție de meserie, substanțele chimice și materiile prime cu care se lucrează, proprietățile lor fizice și chimice, concentrația lor pe unitatea de spațiu. Pentru fiecare ramură se fac considerații asupra riscului de expunere a lucrătorilor la diverse substanțe, materiale și produse posibil nocive, luîndu-se în evidență și alte efecte toxice, inflamatorii și alergice produse de acestea.

Pentru fiecare ramură sînt expuse și tipurile de neoplasme apărute la lucrătorii care își desfășoară activitatea în meseriile respective.

Frecvența apariției bolilor în diversele regiuni geografice este în funcție și de tehnologia folosită, de modul de dezvoltare a industriei lemnului sau pielăriei în țările respective.

Fiecare capitol se încheie cu un sumar și o evaluare a datelor studiate.

Apendixul de la sfîrșit completează monografia cu cîteva date statistice privind mortalitatea datorită cancerului la lucrătorii din cele două industrii ; sînt enumerate substanțele chimice care se folosesc sau care se produc în aceste industrii și în cele asociate, ca și o serie de substanțe colorante folosite.

Lucrarea cuprinde un glosar, o erată pentru volumele 1—24 și un index cumulativ al monografiilor IARC asupra riscului carcinogenic al substanțelor chimice pentru om.

Elisabeta Mihăilescu

Mathematical and computational methods in physiology (Metode matematice și computaționale în fiziologie), Adv. Physiol. Sci., vol. 34, L. FEDINA, B. KANYAR, B. KOCSIS, M. KOLLAI (sub red.), Pergamon Press, New York, 1981, 336 p.

Volumul reprezintă o culegere a lucrărilor prezentate în cadrul celui de-al 28-lea Simpozion de științe fiziologice, care a avut loc la Budapesta în anul 1980.

Corespunzător celor trei secțiuni de desfășurare a lucrărilor acestui prestigios congres de fiziologie, sînt inserate rezultate recente ale cercetării în domeniul utilizării metodelor matematice și computaționale în biologie, în general, și în fiziologie, în special.

Prima parte cuprinde preocupările legate de modelare și simulare în sistemele fiziologice. Dintre contribuțiile prezentate sînt de menționat : aspecte ale controlului homeostaziei corporale : simularea numerică a transportului apei ; aplicarea modelelor biomecanice în determinarea

stabilității sistemului cardiovascular în timpul zborului cosmic ; criterii pentru simularea la computer a interacțiunii receptor-medicament.

A doua secțiune se referă la organizarea experimentelor și estimarea parametrilor. Printre subiectele abordate, un loc important îl ocupă echivalarea structurală a modelelor compartimentale, modelele cinetice și estimarea parametrilor în diferite sisteme compartimentale.

Computerele în laboratorul de fiziologie, analiza biosemnalelor analoge, constituie obiectul celei de-a treia părți. Sînt notate cu deosebire datele obținute în domeniul inverstigării aparatului cardiovascular, și al activității sistemului nervos.

Fiecare secțiune este însoțită de o sinteză a cunoștințelor în domeniul respectiv, prezentată de cîte unul dintre autorii acestui util volum pentru specialiștii din domeniul fiziologiei animale.

Al. G. Marinescu

Pathobiochemie der Leber (Patobiochimia ficatului) : *Bausteine der Pathophysiologie und Pathobiochemie* (Elementele patofiziologiei și patobiochimiei), 167 p., 45 fig.

Lucrarea este o monografie prezentată într-o formă accesibilă atît medicilor cît și biochimiștilor interesați în domeniul patobiochimiei ficatului. Acest domeniu conține cauzele, caracteristicile metabolice, desfășurarea și terapia bolilor de ficat. După o scurtă introducere în biochimia ficatului sînt expuse: mecanismele de lezare a ficatului, metabolismul ficatului lezat, tumorile, biotransformările, aparatul de secreție a bilei, pietrele vezicii, lezările medicamentoase-toxice ale ficatului, depozitele patologice, tulburările metabolismului porfirinic, bazele unui diagnostic rațional.

În patobiochimia ficatului, alături de cunoștințele sigure, mai există o serie de probleme și goluri, care constituie puncte de plecare pentru noi cercetări.

Se arată că metodele noi de diagnostic trebuie privite ca un sistem dinamic, în curs de dezvoltare, în care noile rezultate ale cercetării patobiochimiei ficatului trebuie adoptate numai după o verificare obiectivă a valorii lor.

Un mare accent este pus pe utilizarea testelor specifice pentru diagnosticarea diferitelor boli.

Astfel, de pildă, se arată că, în timp ce pentru determinarea capacității de sinteză a ficatului, dozarea albuminei e foarte potrivită, în alte situații, ca, de exemplu, în necroza acută a ficatului, mai potrivită (datorită timpului lor de înjumătățire mai scurt) este determinarea proconvertinei, colinesterazei și protrombinei.

Determinarea glutamatdehidrogenazei poate fi folosită cu succes ca indicator sensibil pentru obstrucția canalului vezicii.

Deosebit de utile în diferite alte situații s-au dovedit dozarea β-glucuronidazei, alanin-aminopeptidazei, leucin-aminopeptidazei etc.

Studiul patobiochimiei ficatului nu e relevant numai pentru diagnosticarea bolilor ficatului, în sens restrîns. Rolul cel mai important al ficatului este descompunerea substanțelor străine organismului, care apar nu numai în diferite locuri de muncă din industria modernă, dar și ca „ecotoxine" foarte răspîndte în mediul ambiant în care trăim. În descompunerea acestor substanțe, ficatul poate provoca formarea unor tumori maligne localizate în diferite alte părți ale organismului. În acest context, importanța studiului științific al patobiochimiei ficatului crește și depășește cu mult limitele cunoașterii acestui organ.

Margareta Dumitrescu

HANDBOOK OF SENSORY PHYSIOLOGY (Manual de fiziologie senzorială), Editorial Board : AUTRUM H., JUNG R., LOEWENSTEIN W. R., MacKAY D. M., TEUBER H.-L., vol. 7, Part 6 : *Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates* (Fiziologia comparată și evoluția vederii la nevertebrate), *C : Invertebrate Visual Centers and Behavior in Invertebrates* (Centrii vizuali și comportamentul la nevertebrate), de AUTRUM H., GOODMAN L.J., MESSENGER J. B., WEHNER R., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 665 p., 216 fig.

Acest volum este alcătuit din patru capitole ; fiecare capitol reprezintă o trecere în revistă a unor probleme privind fiziologia vederii la nevertebrate.

Capitolul I, intitulat „Adaptarea la lumină și întuneric la nevertebrate", de H. Autrum, cuprinde în 91 pagini detalierea mecanismelor de adaptare, eficiența și sensibilitatea, precum

și aspecte ale dezvoltării vederii. În subcapitolul „Mecanismele adaptării" se compară rolul pupilei la cefalopode și anelide. Se studiază, între altele, rolul pigmentului de protecție, mișcarea și migrația lui, cisternele perirabdomerice intracelulare, spațiile intercelulare și mișcările retinomotoare. Sînt prezentate de asemenea potențialele receptorilor, ciclul fotochimic al vederii, chimia și biologia membranelor implicate în procesele vizuale.

Capitolul II, intitulat „Fiziologia comparată a vederii la moluște", de J. B. Messenger cuprinde, în 106 pagini, descrierea comparată a principalelor tipuri de organe vizuale la poliplacofore, gastropode (*Prosobranchia, Opisthobranchia, Pulmonata*), la bivalve și la cefalopode. Cu excepția subcapitolului consacrat cefalopodelor, la celelalte grupe de moluște se prezintă descrierea comparată a principalelor tipuri de organe vizuale și se fac considerații corecte legate de adaptarea vederii și a organelor vizuale la mediul de viață. În subcapitolul consacrat cefalopodelor se fac precizările cuvenite complexității fenomenului vizual la aceste organisme, descriindu-se cristalinul și pupila, retina, pigmenții vizuali, electrofiziologia retinei și a segmentului extern, bazele chimice ale activității fotoreceptoare, vederea în culori, fotorecepția extraoculară etc.

Capitolul III, intitulat „Organizarea și fiziologia sistemului ocelar dorsal al insectelor", de Lessley, J. Goodman, prezintă, în 82 pagini, distribuția, dezvoltarea și organizarea structurală a sistemului ocelar la insectele adulte. Se descriu de asemenea structurile ocelare anormale, calea ocelară în creier și torace și relațiile sinaptice și nervoase între oceli și sistemul nervos central. În subcapitolul privind fiziologia se descrie răspunsul celulelor receptoare la lumină, transmiterea informației în axonul celulei receptoare și sensibilitatea spectrală a ocelilor. Capitolul se încheie cu interacțiunea sistemului ocelar cu celelalte modalități vizuale ale insectelor.

Ultimul și cel mai voluminos este capitolul IV, intitulat „Viziunea spațială la artropode", de R. Wehner. În 263 pagini se prezintă particularitățile percepției vizuale spațiale la ochii compuși și la ochii cu cristalin unic, controlul vizual al deplasării proprii, detectarea, fixarea și urmărirea obiectelor văzute, cu o analiză experimentală a modalităților de discriminare de la albine.

Cartea cuprinde 216 figuri, constituite din desene și fotografii de foarte bună calitate și 24 tabele. Literatura de la cele patru capitole ocupă un total de 96 pagini. Cartea se termină cu un index de autori și un index pe subiecte.

Acest volum este util specialiștilor în fiziologia comparată a vederii, cercetătorilor morfologi, biofizicienilor și specialiștilor în bionică. De asemenea, prezintă un mare interes pentru zoologii specialiști în biologie generală și autecologie.

C.-C. Prunescu

Lesion-Induced Neuronal Plasticity in Sensorimotor Systems (Plasticitatea neuronală indusă de leziune în sistemele senzorimotoare), sub red. H. FLOHR, W.PRECHT, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 401 p., 168 fig.

În cele două secțiuni ale volumului sînt cuprinse un număr de 33 de lucrări prezentate la un simpozion în cadrul celui de-al 28-lea Congres internațional de fiziologie, care a avut loc la Bremen în iulie 1980,

În prima parte a cărții sînt tratate unele aspecte generale ale plasticității neuronale și sînt puse în discuție teoriile curente privind restabilirea funcțională, ca și unele aspecte morfologice, fiziologice, neurochimice, moleculare și ontogenetice.

Astfel, se evidențiază faptul că apariția, maturizarea și degenerarea celulelor nervoase, mecanismul creșterii și direcționării axonilor către structurile țintă și interacțiunea celulelor nervoase la nivelul sinapselor nu par a fi strict determinate.

Dezvoltarea și menținerea sistemului nervos al vertebratelor rezută mai mult dintr-un echilibru existent ; plasticitatea neuronală este o proprietate intrinsecă și esențială a sistemului nervos. Dacă un element al acestui sistem echilibrat se dezvoltă prea mult sau se distruge, elementele care rămîn se reorganizează și restabilesc un nou echilibru.

Aceasta are loc nu numai după intervenții chirurgicale, ci chiar în timpul ontogenezei, ceea ce a dus la concluzia că degenerarea neuronilor (produși într-un număr mai mare decît este necesar pentru rețeaua complexă neuronală) în timpul ontogenezei nu este un paradox, ci o parte necesară și semnificativă a ontogenezei normale.

Din lucrările primei părți a acestui volum se desprinde ideea că sistemele senzorimotoare nu sînt rețele rigide, imuabile, ci structuri foarte plastice, care își modifică întreaga înfățișare ca răspuns la schimbările ce au loc în condițiile interne și externe.

Leziunile sau contorsionările căilor aferente ale sistemului, care inițial produc o dezorganizare funcțională, induc o activă reorganizare, care adesea conduce la redobîndirea funcțiilor.

Exemple de plasticitate neuronală indusă prin leziuni se cunosc de foarte mulți ani, dar este meritul autorilor de a evidenția rolul acestor experimente ca mijloace de cercetare a organizării și funcționării sistemului nervos. Ei sugerează că sechelele fiziologice și biochimice sînt procese celulare care pot fi un model folositor pentru studierea relațiilor trofice din sistemul nervos central (SNC) al mamiferelor. Astfel, lezarea axonală a fost folosită ca model pentru studierea distribuției intracerebrale a sistemelor neuronilor colinergici și pentru studierea proceselor generale prin care celulele nervoase din creier răspund la leziuni.

O serie de lucrări din acest volum sugerează faptul că plasticitatea sinapselor reprezintă unul dintre mecanismele posibile de restabilire funcțională după leziuni cerebrale.

Înmugurirea axonilor și formarea de noi sinapse sînt foarte importante. Refacerea sinapselor și a axonilor în sistemul nervos central al mamiferelor se datorește și unor procese biochimice.

Unii autori ai lucrărilor din această carte studiază schimbările care au loc în enzimele implicate în sinteza neurotransmițătorilor în timpul înmuguririi regenerative,compensatoare și colaterale axonale la neuronii catecolaminergici centrali la mamiferele în dezvoltare sau adulte.

Restabilirea funcțională ca urmare a unor prejudicii aduse SNC este legată de unele procese prin care se modifică transmiterea sinaptică și prin mecanisme care facilitează neurotransmiterea chimică.

Înmugurirea axonală, regenerarea și reinervarea structurilor țintă (parțial denervate) prin fibrele aferente reziduale au fost observate într-un număr de arii cerebrale la o varietate de specii.

Existența acestui fenomen a condus la acceptarea generală a ideii că axonii intacți din SNC al mamiferelor rețin o parte din capacitatea lor de creștere chiar la maturitate, dar această capacitate depinde tot mai mult, pe măsura înaintării în vîrstă, de o serie de factori intrinseci sau externi. Restabilirea funcțională de asemenea se face mult mai rapid cînd leziunea se produce la mamiferele pui sau tinere în comparație cu adulții și acest lucru este evidențiat prin datele experimentale expuse în cîteva lucrări din acest volum.

Foarte interesantă este ultima lucrare a primei părți a cărții, care evidențiază că unele leziuni condiționate (leziuni minore care se execută înaintea altor leziuni pentru inițierea regenerării) pot produce o accelerare și chiar o exagerare a creșterii axonale și că aceasta reprezintă o modalitate experimentală care poate elucida factorii ce inițiază. și controlează regenerarea axonală.

Autorii discută mecanismele posibile care au loc și aplicațiile practice ale efectelor leziunilor condiționate în transplantele de mușchi, în grefele de nervi, în cazul secționării măduvei spinării.

În partea a doua a volumului sînt prezentate o serie de modele experimentale și tehnici pentru ilustrarea plasticității neuronale, indusă de leziuni în sistemele senzorimotoare specifice ale măduvei spinării, în sistemul vestibular, oculomotor, vizual, olfactiv și în cerebel.

Restabilirea funcțională postlezională a fost urmărită de unii cercetători prin studierea comportamentului atît al animalelor experimentale, cît și al celor de control.

Alți autori au studiat efectele unor medicamente în regenerarea structurilor nervoase lezate.

Importanța cercetărilor efectuate de către autorii lucrărilor din volumul de față este cu atît mai mare, cu cît studierea proceselor ce stau la baza plasticității neuronale în diversele segmente ale sistemului nervos a elucidat o serie de mecanisme. Astfel, studierea proceselor care stau la baza compensării vestibulare a condus la un progres în înțelegerea mecanismelor memoriei și a fenomenului de învățare.

Este un merit al editorilor de a fi cumulat în acest volum cele mai recente date teoretice și experimentale privind plasticitatea neuronală, date care conduc la aprofundarea cunoștințelor despre organizarea morfologică și funcțională a sistemului nervos și care reprezintă un progres pentru neurologie.

Elisabeta Mihăilescu

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel ştiinţific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedent de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : 78200 — Bucureşti 2, P. O. B. 2—2.

1982 JUL 1 21

ÎN CURS DE APARIŢIE
LA EDITURA ACADEMIEI:

CORNEL BODEA, VIORICA CUCU şi CRISTINA CIOACĂ, **Tratat de biochimie vegetală.** Partea a II-a: **Compoziţia chimică a principalelor plante de cultură,** vol. IV: **Plante medicinale şi aromatice**

Continuare a celor trei volume din tratat apărute în anii 1964—1966, acest volum, elaborat în baza unui plan de concepţie originală, prezintă originea, răspîndirea, importanţa practică şi compoziţia chimică a unui număr de 62 de plante medicinale şi aromatice cultivate la noi şi în alte ţări, incluzînd specii ca *Atropa belladonna* (mătrăguna), *Coffea arabica* (arborele de cafea), *Digitalis purpurea* şi *D. lanata* (degeţelul), *Humulus lupulus* (hameiul), *Mentha piperita* (menta), *Papaver somniferum* (macul), *Thea sinensis* (ceaiul), *Valeriana officinalis* (odoleanul) etc.

Materialul privitor la compoziţia chimică este grupat în trei părţi. Se arată mai întîi compoziţia chimică a acelor organe ale plantei care justifică din punct de vedere practic cultivarea ei, nelipsind datele privind compoziţia chimică a celorlalte organe. Sînt analizate apoi modificările survenite în compoziţia chimică sub acţiunea factorilor externi (factori pedoclimatici, îngrăşăminte şi irigaţii, dăunători). Urmează probleme de ameliorare ce vizează îmbunătăţirea calitativă a organelor folositoare ale plantei. Pentru prima dată în literatura de specialitate este înfăţişată într-o unitate de tratare compoziţia chimică a plantei întregi.

Prin conţinutul său, volumul oferă un material documentar cu o largă adresabilitate, interesînd deopotrivă pe farmacişti, medici, biochimişti, fiziologi, biologi, tehnicieni din industria farmaceutică şi din alte industrii prelucrătoare de plante medicinale şi aromatice.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 25, NR. 1, P. 1—120, BUCUREŞTI, IANUARIE—IUNIE 1982

c. 2067 I. P. Informaţia

43816

Lei 30

1330

66.

8-18

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 25

1982

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 25, nr. 2, p. 121—194, 1982, Bucureşti

SCBIAS 25 (2), 1982

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an.
Prețul unui abonament este de 60 de lei.
În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale.
Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O.Box 136–137, telex 11226, 79517 — București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P.O.Box 2–2, 78200, București 2, România

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

MŰSZAKI INFORMÁCIÓS KÖZPONTI ÉS KÖNYVTÁR 1983

Tomul 25, nr. 2 1982

IULIE—DECEMBRIE

SUMAR

OAMENII DE ŞTIINŢĂ ŞI PACEA 123

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V.V. PAPILIAN, Acţiunea plumbului asupra glicemiei şi toleranţei intravenoase la glucoză la şobolani 125

VLAD ARTENIE, MARIA APETROAIEI, KLAUS BATTES, Activitatea proteazelor şi α-amilazei digestive la păstrăvul curcubeu *(Salmo gairdneri* Rich.) şi la crapul de cultură *(Cyprinus carpio* L.) în condiţii de creştere superintensivă 131

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, N. PREDA, D.I. ROŞCA, Rolul protector al vitaminei E faţă de un aport crescut de cadmiu la şobolan 136

V. DARIE, Modificări calitative şi cantitative ale proteinelor hepatice în diabetul aloxanic 142

Á. GYÉRESY, I. BĂRA, G. RÁCZ, Micrometodă pentru stabilirea conţinutului în alcaloizi la calusul de *Papaver somniferum* L. 147

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, T. BENŢIA, Determinarea selectivă a α-amilazei prin difuzie radială, utilizînd amiloza reticulată (notă preliminară) 150

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, C. BODEA, Cercetări preliminare asupra compuşilor steroidici din culturile de ţesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait. 154

R. OLINESCU, T. GIDOIU, T. SAFTA, E. POPESCU, Mecanisme biochimice implicate în acţiunea farmacodinamică a propolisului. I. Acţiunea *in vitro* asupra albuminei şi proteinelor serice 158

DOINA OŞIANU, V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, N. BICHIŞ, Cercetări privind efectul unor reziduuri de morcovi asupra calităţii produselor avicole 165

HORST D. SCHELL, MELANIA ARSENE, Studiul proprietăţilor catalitice ale kalicreinei imobilizate pe agaroză reticulată şi activată cu BrCN 170

ALEXANDRINA ŞTIRBEŢ, GR. TURCU, Fotooxidarea ireversibilă a clorofilelor *in vitro* 178

V. TĂMAŞ, O. Z. BABIO, Carotenoide din lapte şi smîntînă de vacă 183

RECENZII 187

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 25, N° 2 1982

JULY — DECEMBER

CONTENTS

SCIENTISTS AND PEACE 123

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V.V. PAPILIAN, Lead action on glycemia and on intravenous glucose tolerance in rats 125

VLAD ARTENIE, MARIA APETROAIEI, KLAUS BATTES, Digestive proteinase and α-amylase activities in rainbow trout *(Salmo gairdneri* Rich.) and culture carp *(Cyprinus carpio* L.) raised in superintensive conditions 131

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, N. PREDA, D. I. ROŞCA, The protective role of vitamin E against increased cadmium in rat 136

V. DARIE, Qualitative and quantitative modifications of hepatic proteins in alloxan diabetes 142

Á. GYÉRESY, I. BĂRA, G. RÁCZ, A micromethod for the determination of alkaloids content in *Papaver somniferum* L. callus 147

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, T. BENŢIA, Selective determination of α-amylase by radial diffusion using cross-linked amylose (CL-amylose) (preliminary note) 150

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, C. BODEA, Preliminary studies on the steroid compounds in leaf-tissue cultures of *Solanum laciniatum* Ait. . . . 154

R. OLINESCU, T. GIDOIU, T. SAFTA, E. POPESCU, Biochemical mechanisms involved in the pharmacodynamic action of propolis. I. *In vitro* action on albumin and serum proteins 158

DOINA OŞIANU, V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, N. BICHIŞ, Researches on the effect of carrots residues on the quality of poultry products 165

HORST D. SCHELL, MELANIA ARSENE, Untersuchung der katalitischen Eigenschaften des an BrCN-aktivierte Agarose gebundenen Kallikreins 170

ALEXANDRINA ŞTIRBEŢ, GR. TURCU, Irreversible photobleaching of chlorophyll solutions 178

V. TĂMAŞ, O.Z. BABIO, Les carotinoides du lait et de la crème de vache 183

REVIEWS 187

OAMENII DE ŞTIINŢĂ ŞI PACEA

SIMPOZIONUL INTERNAŢIONAL „OAMENII DE ŞTIINŢĂ ŞI PACEA"

În zilele de 4—5 septembrie 1981 s-au desfăşurat la Bucureşti, sub înaltul patronaj al preşedintelui Republicii Socialiste România, tovarăşul Nicolae Ceauşescu, lucrările Simpozionului internaţional „Oamenii de ştiinţă şi pacea".

La simpozion au participat 68 de oameni de ştiinţă din 32 de ţări, laureaţi ai Premiului Nobel, preşedinţi ai unor academii de ştiinţe, alte personalităţi ştiinţifice de prestigiu din lumea contemporană. Au luat parte de asemenea directori generali ai unor organizaţii internaţionale.

La deschiderea simpozionului a fost prezentat Mesajul preşedintelui Republicii Socialiste România, tovarăşul Nicolae Ceauşescu, adresat participanţilor.

Exprimînd înalta concepţie a secretarului general al Partidului Comunist Român, preşedintele R. S. România, asupra problemelor păcii şi securităţii internaţionale, destinderii şi dezarmării, cooperării şi înţelegerii între popoare în cadrul eforturilor pentru făurirea unei noi ordini economice internaţionale, asupra răspunderii oamenilor de ştiinţă faţă de soluţionarea sarcinilor naţionale şi globale prin punerea celor mai avansate cuceriri ale revoluţiei tehnico-ştiinţifice contemporane exclusiv în serviciul dezvoltării paşnice a popoarelor, adresînd savanţilor din întreaga lume chemarea de a-şi uni rîndurile în lupta împotriva pericolului pe care îl prezintă crizele, confruntările şi războiul pentru soarta omenirii, Mesajul preşedintelui Nicolae Ceauşescu a orientat întregul curs al simpozionului.

În cuvîntul participanţilor au fost susţinute ideile directoare ale Mesajului preşedintelui României.

În încheierea lucrărilor, participanţii au adoptat un apel către oamenii de ştiinţă din întreaga lume, care, reflectînd ideile fundamentale ale Mesajului tovarăşului Nicolae Ceauşescu, a propus constituirea unui comitet de iniţiativă pentru organizarea Congresului mondial „Oamenii de ştiinţă şi pacea".

Ca o continuare firească a acestei prestigioase reuniuni internaţionale, a fost constituit Comitetul Naţional Român „Oamenii de ştiinţă şi pacea", care a ales, în unanimitate, în calitate de preşedinte al Comitetului şi de preşedinte al Biroului Executiv al Comitetului pe tovarăşa academician

doctor inginer Elena Ceaușescu, prim-viceprim-ministru al guvernului R. S. România, președintele Consiliului Național pentru Știință și Tehnologie, ilustru om politic și savant de renume internațional.

Comitetul Național Român „Oamenii de știință și pacea" a adoptat un bogat plan de manifestări științifice, menit să ilustreze contribuția oamenilor de știință din țara noastră la eforturile poporului român, alături de toate popoarele lumii, pentru salvgardarea păcii.

Comitetul Național Român „Oamenii de știință și pacea" desfășoară acțiuni pe plan internațional în vederea pregătirii Congresului mondial „Oamenii de știință și pacea". Comitetul va fi reprezentat de asemenea la Sesiunea specială a Adunării Generale a Organizației Națiunilor Unite consacrată dezarmării.

ACŢIUNEA PLUMBULUI ASUPRA GLICEMIEI ŞI TOLERANŢEI INTRAVENOASE LA GLUCOZĂ LA ŞOBOLANI

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, V.V. PAPILIAN

Rezumat. Acetatul de plumb administrat zilnic intragastric, timp de 30 de zile, la şobolani albi, masculi şi femele, în concentraţie de 200 ppm Pb^{2+} a dus la modificări semnificative ale glicemiei, modificări mai accentuate la şobolanii masculi.

Folosind testul rapid de toleranţă i.v. la glucoză, s-a dovedit că plumbul scade viteza de penetrare a glucozei din sînge în ţesuturi atît la şobolanii masculi cît şi la femele, modificările fiind mai severe la şobolanii masculi.

Aspectul histopatologic al pancreasului endocrin evidenţiază o scădere a numărului insulelor Langerhans la şobolanii de ambele sexe trataţi cu plumb.

Pe baza rezultatelor obţinute, se poate presupune că unul dintre mecanismele de afectare a homeostaziei glucozei (apariţia hiperglicemiei) în intoxicaţia experimentală cu plumb s-ar putea datora interacţiunii acestui metal cu procesele de secreţie a insulinei.

Plumbul este un contaminant important al mediului înconjurător, care, în concentraţii crescute, poate exercita efecte toxice variate asupra organismului animal şi uman.

Se cunoaşte astfel că acţiunea plumbului este complexă, fiind considerat un toxic enzimatic graţie afinităţii sale crescute pentru grupările SH şi fosfat ale multor enzime şi proteine de structură (1), (2), (3).

Se presupune de asemenea că modificările în permeabilitatea celulară (hematii, testicul, ficat, rinichi, creier) s-ar datora interacţiunii plumbului cu grupările SH şi fosfat din liganţii din membrană (4), (5).

În acest fel, plumbul, asemănător acţiunii toxice a altor metale grele (6), (7), interferă cu procesele de metabolizare şi utilizare celulară a hidraţilor de carbon, ducînd în final la o privare a organismului de aport energetic.

Pornind de la aceste considerente şi avînd în vedere insuficienţa de date cu privire la interacţiunea acestui metal cu unii factori de reglare metabolică (8), (9), (10), în lucrarea prezentă ne-am propus să studiem acţiunea plumbului asupra glicemiei, testul intravenos de toleranţă la glucoză şi aspectul histopatologic al pancreasului endocrin la şobolani, masculi şi femele.

Testul intravenos de toleranţă la glucoză face parte din testele biologice de evidenţiere a activităţii secretorii a pancreasului endocrin, indicînd gradul de eficienţă a insulinei endogene asupra utilizării glucozei de către ţesuturi (11), (12).

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe şobolani albi, femele şi masculi, în greutate iniţială de 160—180 g.

Animalele tratate cu plumb au primit zilnic, intragastric, acetat de plumb în apă, în concentraţie de 200 ppm Pb^{2+}, timp de 30 de zile.

Animalele martor au primit zilnic, intragastric, apă de robinet.

Experienţele s-au efectuat la 24 de ore de la ultima administrare şi o inaniţie de 18 ore.

Încărcarea intravenoasă rapidă cu glucoză a fost efectuată (sub anestezie cu nembutal 5 mg/100 g şobolan, administrat i.p.) prin injectarea unei cantităţi de 50 mg glucoză pe 100 g greutate corporală (dintr-o soluţie de glucoză de 20%, printr-una din venele cozii).

Probele de sînge au fost recoltate la intervale de 5, 10, 15 şi 20 de minute, iar glicemia a fost determinată din cîte 0,05 ml sînge, folosindu-se metoda enzimatică Hugget (13).

Evaluarea matematică a testului de toleranţă i.v. la glucoză s-a făcut prin calcularea vitezei de penetrare a glucozei din sînge în ţesuturi, exprimată prin constanta K şi intervalul de timp (minute) de revenire a glicemiei de la injectarea i.v. pînă la o valoare aproximativ egală cu nivelul glicemiei iniţiale pe baza reprezentării semilogaritmice a curbelor hiperglicemiei provocate, aplicînd procedeul lui Conard (14) şi Cristophe (15).

Examenul histopatologic al pancreasului s-a efectuat după o prealabilă fixare în reactiv Bouin, colorare cu hematoxilină-eozină şi citire la microscop binocular, obiectiv 40.

Avînd în vedere posibilitatea existenţei unei competiţii între plumb şi zinc pentru locul de legare în molecula de insulină, am dozat plumbul şi zincul din pancreas folosind metoda spectrofotometrică în absorbţia atomică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aşa cum rezultă din tabela 1, glicemia prezintă creşteri semnificative la toţi şobolanii intoxicaţi cu plumb, şobolanii masculi prezentînd creşteri mai pronunţate (71%) comparativ cu femelele (34%), cu o semnificaţie statistică între cele două loturi de $p<0,02$.

Constanta K (tabela 1, fig. 1 şi 2), care măsoară viteza de penetrare a glucozei din sînge în ţesuturi, este scăzută semnificativ la cele două

Tabela 1

Glicemia şi valorile constantei K şi T_i la şobolani masculi şi femele intoxicaţi cu plumb

Sexul	Lotul	Glicemia (mg%)	Constanta K	T_i
Femele	martor	$\bar{x} = 53,6 \pm 7,59$ (10)	$\bar{x} = 6,22 \pm 0,93$ (9)	$\bar{x} = 21,1 \pm 2,0$ (9)
	intoxicat	$\bar{x} = 71,9 \pm 4,0$ (10) $p<0,001$ (34,0%)	$\bar{x} = 4,67 \pm 0,42$ (10) $p<0,001$ (24,9%)	$\bar{x} = 27,8 \pm 4,3$ (10) $p = 0,001$ (31,7%)
Masculi	martor	$\bar{x} = 50,1 \pm 7,3$ (10)	$\bar{x} = 5,65 \pm 0,53$ (10)	$\bar{x} = 22,7 \pm 1,9$ (10)
	intoxicat	$\bar{x} = 85,8 \pm 9,2$ (10) $p<0,001$ (71,2%) $p(q) <0,001$	$\bar{x} = 4,18 \pm 0,48$ (9) $p<0,001$ (26,4%) $p(q) <0,02$	$\bar{x} = 31,3 \pm 1,6$ (9) $p<0,001$ (37,8%) $p(q) <0,02$

Notă. ( ) număr de animale de experienţă; (%) modificări procentuale faţă de martor.

loturi de animale tratate cu plumb ($p<0,001$), diferenţa dintre lotul de şobolani masculi şi femele fiind $p<0,02$.

T_1, care măsoară timpul de dispariţie a glucozei administrate (tabela 1, fig. 1 şi 2), la şobolanii ambelor loturi tratate cu plumb este semnificativ mai prelungit în comparaţie cu şobolanii martor ($p<0,001$). Semnificaţia diferenţelor dintre cele două sexe de şobolani şi în acest caz este $p<0,02$.

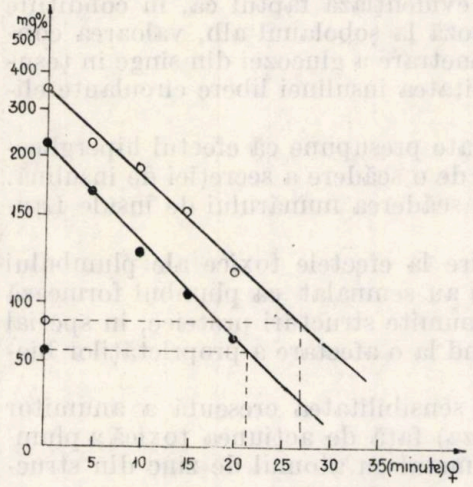


Fig. 1. — Reprezentarea semilogaritmică a curbelor hiperglicemiei provocate la şobolani femele : martori (—●—●—) şi intoxicaţi cu plumb (—o—o—).

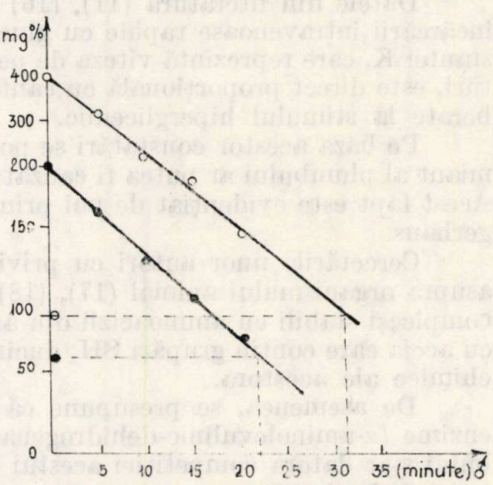


Fig. 2. — Reprezentarea semilogaritmică a curbelor hiperglicemiei provocate la şobolani masculi : martori (—●—●—) şi intoxicaţi cu plumb (—o—o—).

Examenul histopatologic al pancreasului endocrin evidenţiază o scădere a numărului de insule Langerhans la şobolanii masculi de 17,7 %, iar la femele de 11,8 % comparativ cu şobolanii martor (tabela 2). Dozarea

Tabela 2

Acţiunea plumbului asupra pancreasului

	Şobolani masculi		Şobolani femele	
	martor	plumb	martor	plumb
Insule Langerhans	$\bar{x} = 17$ (6)	$\bar{x} = 14$ (6) (17,7 %)	$\bar{x} = 17$ (6)	$\bar{x} = 15$ (6) (11,8 %)
Zinc	$\bar{x} = 11,44 \pm 0,72$ (10)	$\bar{x} = 0,95 \pm 2,2$ (10) $p<0,05$		
Plumb	$\bar{x} = 0,052 \pm 0,03$ (10)	$\bar{x} = 0,550 \pm 0,21$ (10) $p<0,001$		

Notă. Număr de insule Langerhans (evidenţiere histologică); conţinut în plumb şi zinc (µg/100 mg ţesut uscat); ( ) număr de animale de experienţă; (%) modificări procentuale faţă de martor.

de plumb şi zinc din pancreas la şobolanii masculi (tabela 2) a pus în evidenţă o creştere a plumbului cu o semnificaţie statistică $p<0,001$ şi o scădere a zincului de 11,3% cu o semnificaţie statistică de $p<0,05$ comparativ cu lotul de animale martor.

Datele din literatură (11), (16) evidenţiază faptul că, în condiţiile încărcării intravenoase rapide cu glucoză la şobolanul alb, valoarea constantei K, care reprezintă viteza de penetrare a glucozei din sînge în ţesuturi, este direct proporţională cu cantitatea insulinei libere circulante eliberate la stimulul hiperglicemic.

Pe baza acestor constatări se poate presupune că efectul hiperglicemiant al plumbului ar putea fi cauzat de o scădere a secreţiei de insulină. Acest fapt este evidenţiat de noi prin scăderea numărului de insule Langerhans.

Cercetările unor autori cu privire la efectele toxice ale plumbului asupra organismului animal (17), (18) au semnalat că plumbul formează complecşi stabili cu aminoacizii din anumite structuri proteice, în special cu aceia care conţin grupări SH, ducînd la o afectare a proprietăţilor biochimice ale acestora.

De asemenea, se presupune că sensibilitatea crescută a anumitor enzime (α-aminolevulinic-dehidrogenaza) faţă de acţiunea toxică a plumbului s-ar datora competiţiei acestui metal cu atomul de zinc din structura enzimei (17).

Date cu privire la mecanismul de acţiune al insulinei la nivel celular (19) arată că integritatea funcţională a acestui hormon depinde de prezenţa legăturilor disulfhidrice, la nivelul cărora se stabilesc legături cu grupările tiolice libere de pe suprafaţa membranei celulare (care intră în componenţa proteică a complexului lipoproteic membranar), ducînd la o creştere a permeabilităţii acestuia.

Modificările de permeabilitate sînt recepţionate de AMP-ciclic, care, la rîndul său, influenţează procesele de metabolizare a glucozei şi a altor substanţe (fig. 3).

În acord cu datele autorilor de mai sus, putem presupune că plumbul ar contracta legături stabile cu grupările tiol active ale cisteinei, împiedi-

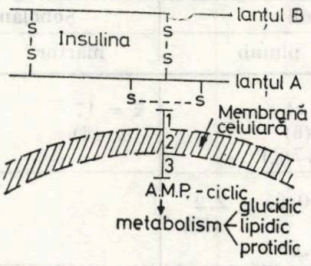


Fig. 3. — Structura şi mecanismul de acţiune al insulinei: *1*, fixarea pe membrană; *2*, mărirea permeabilităţii membranei celulare pentru substanţe extracelulare; *3*, activitatea receptorilor insulinici.

cînd formarea legăturilor disulfhidrice şi fixarea zincului în molecula de insulină, ducînd în acest fel la frînarea sintezei şi a secreţiei de insulină în pancreas.

În favoarea acestor fapte pledează creşterea depozitelor de plumb şi scăderea zincului, evidenţiată de noi în acest experiment.

Afectarea homeostaziei glucozei, evidenţiată de noi sub acţiunea toxică a plumbului, ar putea fi urmarea acţiunii directe a acestui metal asupra secreţiei de insulină, ducînd la o serie de efecte caracteristice unui deficit de insulină (fig. 4):

— scăderea permeabilităţii membranei celulare pentru glucoză, evidenţiată prin scăderea constantei K;

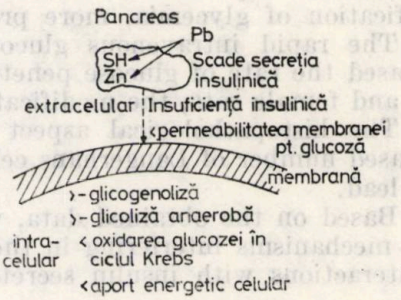


Fig. 4. — Mecanismul posibil de acţiune al plumbului la nivelul pancreasului; consecinţe asupra metabolismului glucozei.

— creşterea glicogenolizei, evidenţiată prin scăderea rezervelor de glicogen din ficat (20);

— creşterea glicolizei anaerobe, evidenţiată prin creşterea piruvicemiei şi a lactacidemiei (20).

Toate aceste procese explică apariţia hiperglicemiei şi duc la o privare a celulelor de aport energetic.

CONCLUZII

1. Acetatul de plumb în concentraţia de 200 ppm Pb^{2+}, administrat la şobolani masculi şi femele, duce la hiperglicemie, mai accentuată la şobolanii masculi.

2. Afectarea homeostaziei glucozei (apariţia hiperglicemiei) ar putea fi consecinţa unei duble acţiuni a plumbului: interacţiunea acestuia cu funcţia secretorie a pancreasului (scădere a numărului de insule Langerhans) şi cu starea funcţională a glandelor suprarenale (hiperfuncţie glucocorticoidă).

3. Scăderea secreţiei de insulină s-ar putea datora interacţiunii plumbului cu grupările funcţionale SH ale aminoacizilor din structura lanţurilor polipeptidice ale insulinei şi competiţiei dintre plumb şi zinc, fapt pentru care pledează creşterea plumbului şi tendinţa de scădere a zincului din pancreas.

4. Şobolanii masculi par a fi mai sensibili la acţiunea toxică a plumbului la nivelul parametrilor biochimici studiaţi de noi.

Prezentat la redacţie
la 2 februarie 1982

Institutul de igienă şi sănătate publică
***Cluj-Napoca**, str. Pasteur nr. 6*

LEAD ACTION ON GLYCEMIA AND ON INTRAVENOUS GLUCOSE TOLERANCE IN RATS

SUMMARY

Lead acetate administered in a dose of 200 ppm Pb^{2+} in drinking water, for 30 days in white male and female rats, led to a significant modification of glycemia, more pronounced in male rats.

The rapid intravenous glucose tolerance test showed that lead decreased the rate of glucose penetration from the blood into tissues in male and female rats, the modifications being more severe in male rats.

The histopathological aspect of endocrine pancreas exhibited a decreased number of Langerhans cells in both males and females treated with lead.

Based on the obtained data, we can suppose that one of the lead toxic mechanisms interfering in the glucose metabolism may be due to its interactions with insulin secretion processes.

BIBLIOGRAFIE

1. J.H. EXON, L. D. KOLLER, N. ISAACSON-KERVLIET, Arch. Environm. Hlth, **34**, 469(1979).
2. J. EISINGER, Quarterly Rev. Biophys., II, **46**, 437(1978).
3. I. POPA, *Toxicologie*, Edit. medicală, Bucureşti, 1978, p. 206.
4. T. D. LUCKEY, B. VENGOPOL, D. HUTEHESON, *Heavy metal Toxicology*, Acad. Press, New York, 1975, p. 34.
5. G. B. GERBER, A. LEONARD, P. JACQUET, Mutation Research, **76**, 415(1980).
6. T. GAFGHAZI, J. H. MENNEAR, Toxicol. Appl. Pharmaceut., **26**, 231(1973).
7. Z. ANCA, teză de doctorat, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1979.
8. I. GONŢEA, P. SUREAC, V. STANCIU, D. LUNGU, Igiena, **13**, 105(1964).
9. D. RAYMOND, Y. MAHOMED, F. ZUHAL, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., **17**, 237(1977).
10. Z. ANCA, S. GABOR, V. V. PAPILIAN, St. cerc. biol., **24**, 127(1981).
11. I. MADAR, E. A. PORA, G. FRECUŞ, Rev. roum. Biol., Série de Zoologie, **14**, 437(1969).
12. I. MADAR, N. ŞILDAN, St. cerc. biol., Seria Zoologie, **25**, 557(1973).
13. S. D. HUGGET, D. A. NIXON, Lancet, *6991*, 376(1957).
14. V. CONARD, J.R.M. FRANCKSON, Arch. Intern. Pharmacodyn., **93**, 277(1953).
15. J. CRISTOPHE, C.R. Soc. Biol., **148**, 1886(1954).
16. I. MADAR, N. ŞILDAN, E.A. PORA, Arch. Intern. Physiol. Biol., **80**, 367(1972).
17. A. De BRUIN, Arch. Environm. Hlth, **23**, 249(1971).
18. D. VALLÉE, D. ULMER, Ann. Rev. Biochem., **41**, 91(1972).
19. E.A. PORA, *Probleme actuale de biologie*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1975, p. 52.
20. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **24**, 127(1981).

ACTIVITATEA PROTEAZELOR ŞI α-AMILAZEI DIGESTIVE LA PĂSTRĂVUL CURCUBEU *(SALMO GAIRDNERI* RICH.) ŞI LA CRAPUL DE CULTURĂ *(CYPRINUS CARPIO* L.) ÎN CONDIŢII DE CREŞTERE SUPERINTENSIVĂ

VLAD ARTENIE*, MARIA APETROAIEI, KLAUS BATTES****

Rezumat. S-a studiat dependenţa dintre activitatea proteazelor şi α-amilazei din tubul digestiv şi compoziţia chimică a hranei administrate păstrăvului curcubeu şi crapului de cultură, crescuţi în condiţii superintensive.
Activitatea specifică a proteazelor din tubul digestiv este mai scăzută la păstrăvul curcubeu şi la crapul de cultură furajaţi cu nutreţ concentrat, faţă de peştii hrăniţi cu hrană naturală.
Activitatea specifică a α-amilazei digestive scade la păstrăvul curcubeu şi creşte la crapul de cultură furajaţi cu nutreţ concentrat, comparativ cu peştii cărora li s-a administrat hrană naturală.

Cercetările privind acvacultura unor specii de peşti în sistem superintensiv ridică o serie de probleme, între care şi cele legate de randamentul de utilizare a hranei şi de răspunsul la diferiţi factori stressanţi.

În testarea diverselor tipuri de hrană, studiul dinamicii activităţii enzimelor proteolitice şi α-amilazei, enzime cu rol fiziologic deosebit în degradarea proteinelor (1) şi a glucidelor (2), este frecvent utilizat (3), (4) şi are importanţă teoretică şi practică.

Lucrarea de faţă prezintă rezultatele unor cercetări referitoare la influenţa diferitelor tipuri de hrană asupra activităţii proteazelor şi α-amilazei din tubul digestiv la crapul de cultură şi la păstrăvul curcubeu. Cercetările au fost efectuate în cursul anului 1979 la baza experimentală de creştere intensivă a crapului de cultură Tansa-Belceşti (jud. Iaşi) şi la crescătoria de păstrăvi din Prejmer (jud. Braşov).

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe două specii de peşti : păstrăv curcubeu *(Salmo gairdneri* Rich.) şi crap de cultură *(Cyprinus carpio* L.), crescuţi în condiţiile dirijate superintensive. În cazul păstrăvului s-au utilizat ca hrană naturală măruntaie proaspete de la abator, iar ca nutreţ combinat furajul concentrat Bicaz-Salmo I (5). Crapul a fost hrănit cu o hrană naturală constituită din bentos şi plancton, folosindu-se ca nutreţ combinat dieta CyXXII (6).

În vederea determinărilor enzimatice, s-au prelevat cite cinci probe paralele din diferite segmente ale tubului digestiv : stomac (I), apendici pilorici (II), porţiunea medie (III) şi porţiunea posterioară (IV) la păstrăv ; porţiunea anterioară (I), porţiunea medie (II) şi porţiunea posterioară (III) a intestinului la crap.

Activitatea proteazelor s-a determinat după metoda Kunitz (7) şi s-a exprimat în micromoli tirozină/g ţesut/60 minute, iar activitatea amilazei prin procedeul cu acid 3,5-dinitrosa-

licilic (8), calculîndu-se în micromoli maltoză/g ţesut/30 minute. Proteinele solubile în extractul enzimatic s-au dozat prin metoda colorimetrică cu reactivul Folin-Ciocâlteu (9). Activitatea specifică a enzimelor cercetate s-a calculat raportînd numărul unităţilor enzimatice la mg de proteină solubilă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Influenţa tipului de hrană asupra activităţii proteazelor şi α-amilazei din tubul digestiv. Rezultatele cercetărilor noastre demonstrează că natura hranei influenţează puternic caracterul secreţiei enzimatice din tubul digestiv la cele două specii de peşti. Faţă de nivelul activităţii specifice a enzimelor studiate la crapul hrănit cu hrană naturală, activitatea specifică a proteazelor scade cu 21,71% (fig. 1, *B*), iar activitatea specifică a α-amilazei înregistrează o creştere de 37,50% (fig. 2, *B*) în tubul digestiv al crapului în vîrstă de două veri (C_1), care a fost furajat cu un nutreţ concentrat, bogat în substanţe extractive neazotate (dieta CyXXII).

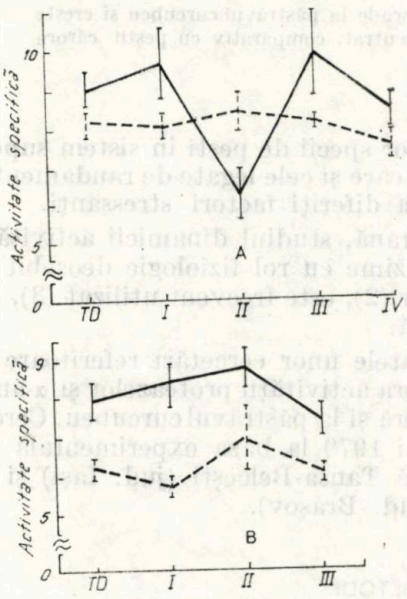


Fig. 1. — Activitatea specifică a proteazelor din tubul digestiv şi diferitele lui porţiuni la *Salmo gairdneri* Rich. (*A*) şi la *Cyprinus carpio* L. (*B*), în vîrstă de un an, după administrarea de hrană naturală (———) sau nutreţ concentrat (— — — —).
A: *TD* — tub digestiv, I — stomac, II — apendici pilorici, III — intestin mediu, IV — intestin posterior.
B: *TD* — tub digestiv, I — intestin anterior, II — intestin mediu, III — intestin posterior.

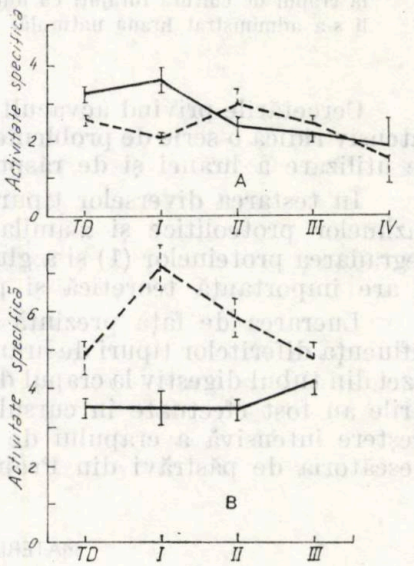


Fig. 2. — Activitatea specifică a α-amilazei din tubul digestiv şi diferitele lui porţiuni la *Salmo gairdneri* Rich. (*A*) şi la *Cyprinus carpio* L. (*B*), în vîrstă de un an, furajaţi cu hrană naturală (———) sau nutreţ concentrat (— — —).
A: *TD* — tub digestiv, I — stomac, II — apendici pilorici, III — intestin mediu, IV — intestin posterior.
B: *TD* — tub digestiv, I — intestin anterior, II — intestin mediu, III — intestin posterior.

Compoziția hranei administrate determină modificări în activitatea enzimatică din tubul digestiv și la păstrăvul curcubeu. Astfel, activitatea specifică a proteazelor (fig. 1, *A*) și α-amilazei (fig. 2, *A*) din întregul tub digestiv este mai redusă la lotul furajat cu nutreț concentrat Bicaz-Salmo I, față de activitatea specifică a acelorași enzime la lotul hrănit cu măruntaie, fenomen ce poate fi pus pe seama unei mai mari adaptări a organismelor respective la hrana naturală.

Relația menționată se evidențiază pentru diferite segmente ale tubului digestiv atît la crap (fig. 1, *B* și 2, *B*), cît și la păstrăv (fig. 1, *A* și 2, *A*). Activitatea specifică a proteazelor are valori maxime în primele două treimi ale tubului digestiv la crap și în stomac și intestinul mediu la păstrăvul curcubeu, după administrarea de hrană naturală, realizîndu-se o digestie și absorbție avansată a acesteia.

Dacă peștii studiați se furajează cu nutreț concentrat, activitatea specifică a proteazelor atinge valoarea maximă în intestinul mediu la crap și în apendicii pilorici la păstrăv, iar în porțiunea posterioară scade sub valoarea întregului tub digestiv la ambele specii (fig. 1, *A* și *B*). Acest fenomen explică valorificarea mai slabă a nutrețului concentrat față de hrana naturală, deoarece nutrețul concentrat, în prima porțiune a tubului digestiv, suferă întîi o inhibiție pronunțată cu apă și sucuri digestive pentru a ajunge la nivelul de hidratare corespunzător hranei naturale, considerat optim pentru activitatea proteazelor la ambele specii de pești (10).

Activitatea specifică a α-amilazei este constant ridicată de-a lungul tubului digestiv al crapului hrănit cu bentos și plancton, fiind maximă în porțiunea a III-a a intestinului. La păstrăvul hrănit cu hrană naturală, activitatea specifică a amilazei este maximă în prima treime a tubului digestiv. Deci, activitatea amilazică este dependentă de natura hranei consumate, mai bogată în glucide la crap (omnivor) decît la păstrăv (carnivor).

Prin administrarea de nutreț concentrat crapului, activitatea specifică a α-amilazei este maximă în porțiunile I și II ale tubului digestiv, această constatare putîndu-se corela cu nivelul mai ridicat al conținutului de poliglucide din furajul concentrat, față de hrana naturală. La păstrăv se constată o activitate amilazică maximă în porțiunea mijlocie a tubului digestiv, fapt ce trebuie corelat cu hidratarea furajului concentrat în prima porțiune a acestuia.

Dependența activității proteazelor și α-amilazei de caracterul speciei peștilor studiați. În literatura de specialitate este acreditată ipoteza conform căreia între păstrăv și crap există deosebiri esențiale la nivelul sistemelor enzimatice digestive, datorită caracterului carnivor al primului și omnivor al ultimului (11), (12).

Urmărind activitatea specifică a proteazelor la nivelul întregului tub digestiv la păstrăvul curcubeu și crap hrăniți cu hrană naturală, nu se constată deosebiri semnificative între cele două specii (fig. 1). Aceasta se poate explica prin faptul că atît păstrăvul, cît și crapul prezintă o creștere maximă a activității proteazelor la administrarea de furaje conținînd 35—40% proteine, predominant de origine animală. Activitatea specifică a α-amilazei crește semnificativ cu 60—150% în porțiunile a

II-a şi a III-a ale intestinului la crap comparativ cu păstrăvul (fig. 2), ceea ce dovedeşte dependenţa dintre acţiunea enzimei şi hrana naturală.

În cazul furajării cu nutreţuri concentrate, diferite din punctul de vedere al compoziţiei chimice, bogate în proteine şi sărace în substanţe extractive neazotate (furajul pentru păstrăv) sau cu un conţinut proteic scăzut şi bogat în substanţe extractive neazotate (furajul pentru crap), se observă la nivelul tubului digestiv diminuarea activităţii specifice proteazelor cu 25% (fig. 1) şi creşterea activităţii specifice a α-amilazei cu 90% la crap faţă de păstrăv (fig. 2). Aceste diferenţe se menţin şi pentru cele trei segmente ale tubului digestiv.

CONCLUZII

1. Activitatea specifică a proteazelor şi α-amilazei din tubul digestiv la crapul de cultură şi la păstrăvul curcubeu crescuţi în sistem superintensiv este influenţată caracteristic de compoziţia hranei administrate.

2. La crapul furajat cu nutreţ concentrat, se remarcă scăderea activităţii specifice a proteazelor şi creşterea activităţii specifice a α-amilazei faţă de crapul martor, hrănit cu bentos şi plancton.

3. Activitatea specifică a proteazelor şi α-amilazei diminuează, în general, la păstrăvul furajat cu nutreţ concentrat faţă de păstrăvul hrănit cu hrană naturală, însă variaţiile observate nu sînt semnificative decît pentru α-amilaza stomacală şi proteazele din apendicii pilorici, pentru acest organ fiind caracteristică o creştere a activităţii ambelor enzime.

4. Administrarea de hrană naturală crapului şi păstrăvului, deşi nu induce modificări semnificative ale activităţii enzimelor studiate la nivelul întregului tub digestiv, determină o creştere pronunţată a activităţii specifice a α-amilazei în ultimele două treimi ale intestinului la crap faţă de păstrăv.

5. Furajarea peştilor menţionaţi cu nutreţul concentrat corespunzător este asociată cu creşterea puternică a activităţii specifice a α-amilazei şi cu micşorarea activităţii specifice a proteazelor atît din întreg tubul digestiv, cît şi din diferite segmente ale acestuia la crap comparativ cu păstrăvul.

Prezentat la redacţie
la 23 martie 1982

* *Universitatea „Al. I. Cuza", Iaşi*
Laboratorul de biochimie
şi
** *Staţiunea de cercetări „Stejarul", Piatra Neamţ (jud. Neamţ)*

DIGESTIVE PROTEINASE AND α-AMYLASE ACTIVITIES IN RAINBOW TROUT *(SALMO GAIRDNERI* RICH.) AND CULTURE CARP *(CYPRINUS CARPIO* L.) RAISED IN SUPERINTENSIVE CONDITIONS

SUMMARY

The dependence of digestive proteinase and α-amylase activities on the chemical composition of the feed administered to the rainbow trout and the culture carp, raised in superintensive conditions, was studied.

The specific activity of the proteinases from the digestive tract was lower in the rainbow trout and in the carp fed on the concentrate diets, as compared with that of the fish given natural feed.

The specific activity of the digestive α-amylase was lower in the rainbow trout and higher in the culture carp, following the administration of the concentrate diets, in comparison with that of the fish given natural feed.

BIBLIOGRAFIE

1. S. BUCHS, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk., **30**, 159(1970).
2. D. M. BELENKI, în *Uspehi biologiceskoi himii*, „Nauka", Moskva, 1971, *12*, p. 164.
3. W. WÜRZEL, *Neue Erkantnisse auf dem Gebiet der Aquacultur*, 1974, p. 74.
4. W. S. HOAR, D. J. RONDALL, *Fish Physiology*, vol. I, Academic Press, New York-London, 1969, p. 391.
5. K. W. BATTES, C. MISĂILĂ, V. ARTENIE, Brevet invenție R. S. România, nr. 68344/1976.
6. K. W. BATTES și colab., Brevet invenție R. S. România, nr. 97704/1979.
7. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **30**, 291(1947).
8. G. NOELTING, P. BERNFELD, Helv. Chim. Acta, **31**, 286(1948).
9. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
10. C. MISĂILĂ, K. W. BATTES, Lucrările Stațiunii „Stejarul", Limnologie, 267(1974—1975).
11. M. KITAMIKADO, S. TACHINO, Nippon Suisan Gakkaishi, **26**, 679(1960), rezumat în Chem. Abstr., **55**, 5789 a(1961).
12. M. KITAMIKADO, S. TACHINO, Nippon Suisan Gakkaishi, **26**, 685(1960), rezumat în Chem. Abstr., **55**, 5789 b(1961).

ROLUL PROTECTOR AL VITAMINEI E FAŢĂ DE UN APORT CRESCUT DE CADMIU LA ŞOBOLAN

MARIA CIUGUDEANU*, SILVIA GABOR*, N. PREDA**, D.I. ROŞCA***

Rezumat. S-au urmărit experimental pe şobolan efectul cadmiului în doză unică de 20 ppm, precum şi acţiunea protectoare a vitaminei E faţă de unele efecte toxice ale acestuia, investigîndu-se următorii parametri : formarea de lipoperoxizi tisulari, activitatea glutationperoxidazei (GSHpx) şi a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (G6PDH) din ficat şi rinichi, precum şi modificările în greutate ale organelor cercetate.

Rezultatele obţinute arată că, în ficat, 20 ppm cadmiu nu modifică semnificativ faţă de martor parametrii investigaţi. Suplimentarea cu vitamină E în prezenţa a 20 ppm cadmiu duce la o scădere semnificativă a lipoperoxizilor şi la o stimulare semnificativă a G6PDH-azei. Această stimulare, schiţată şi la animalele tratate cu cadmiu, determină o creştere de NADPH, probabil necesar proceselor de detoxifiere hepatică solicitate în intoxicaţia cu cadmiu.

La nivel renal, 20 ppm cadmiu provoacă o creştere semnificativă a lipoperoxizilor tisulari şi o inhibiţie a activităţii GSHpx şi a G6PDH-azei. O suplimentare în dietă cu vitamină E limitează formarea în exces de lipoperoxizi renali indusă de cadmiu.

Lucrări recente relevă efectul peroxidativ al metalelor atît *in vitro* (1), cît şi *in vivo* (2), (3). Astfel, Levander (2) arată că unul dintre mecanismele de manifestare a toxicităţii plumbului la nivelul membranei eritrocitare este peroxidarea lipidelor polinesaturate membranare. Formarea de lipoperoxizi în intoxicaţia cu cadmiu în diferite organe, ca rinichi, testicule, a fost demonstrată experimental (3), proces care s-ar datora fie distrugerii lipidelor membranare, fie denaturării grupărilor tiolice la nivelul membranelor celulare (4).

Peroxizii formaţi în exces sînt toxici celulari foarte puternici, declanşînd o reacţie în lanţ, care conduce ulterior fie la distrugerea membranelor celulare, fie la formarea unor intermediari foarte reactivi, ce pot da combinaţii cu macromoleculele vitale.

Prezenţa unor antioxidanţi, ca seleniul, vitamina E, compuşii tiolici, poate împiedica producerea excesivă de peroxizi la contactul cu toxicele celulare (2), (5), (6). Efectul protector al antioxidanţilor se manifestă în raport cu specificitatea reacţiilor, acţionînd prin mecanisme ca prevenirea pierderii hidrogenului de la carbonii α-metilenici, inhibarea clivării hidroperoxizilor sau îndepărtarea radicalilor liberi formaţi (5).

În lucrarea de faţă, ne-am propus să urmărim experimental efectul cadmiului singur sau în asociaţie cu vitamina E asupra peroxidabilităţii

---

Asistenţa tehnică : Maria Văscan.

tisulare în ficat și rinichi la șobolan, precum și eficiența glutationperoxidazei, enzimă cu potențial antioxidant, a cărei activitate este condiționată și de integritatea funcțională a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experimentul s-a efectuat pe aproximativ 35 de șobolani albi, femele, în greutate de 165—200 g.

S-au alcătuit următoarele loturi :

— animale tratate cu cadmiu în doză unică de 20 ppm, sub formă de clorură, administrat în apă prin tubaj gastric ;

— animale tratate cu doză unică de cadmiu 20 ppm și suplimentată zilnic timp de patru săptămîni în dietă cu vitamina E, în doză finală de 1,488 g/șobolan ;

— animale martor, cărora li s-a administrat o singură dată apă de băut, în volum echivalent loturilor de animale intoxicate.

După patru săptămîni, animalele au fost sacrificate. Ca parametri de evaluare s-au urmărit : greutatea corporală, greutatea ficatului, a rinichilor și a ovarelor, formarea de lipoperoxizi prin colorație cu acid tiobarbituric (7), activitatea glutationperoxidazei (GSHpx) (8) și a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (G6PDH) (9) din ficat și rinichi.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute au fost calculate statistic prin testul „t'' Student și reprezentate grafic în figurile 1 și 2.

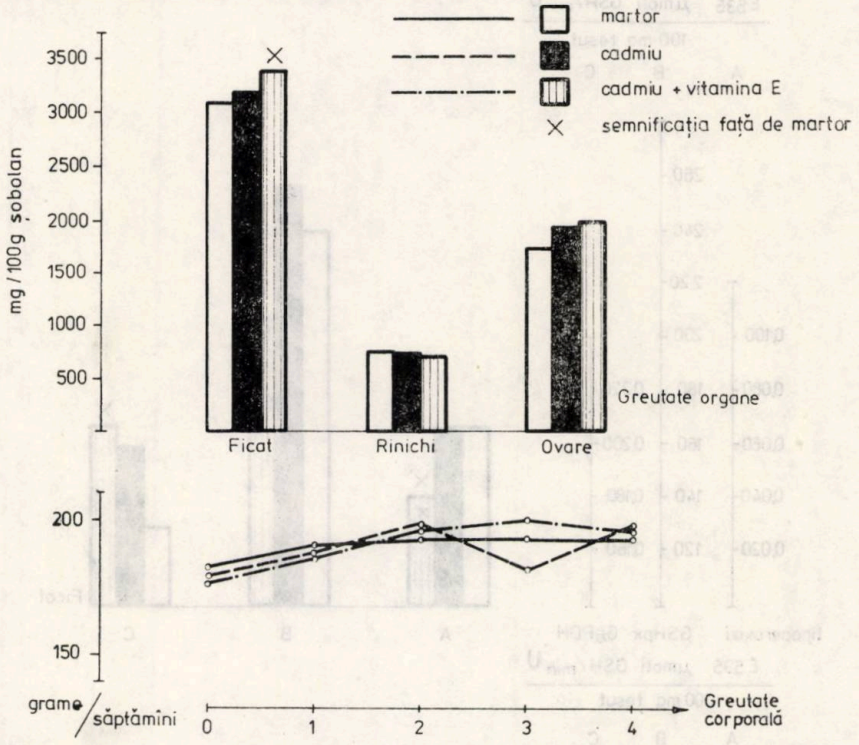


Fig. 1. — Variația greutății corporale, a ficatului, a rinichiului și a ovarelor la loturile de animale studiate.

Urmărind evoluția greutății corporale de-a lungul celor patru săptămîni, nu se constată modificări semnificative față de martor (fig. 1).

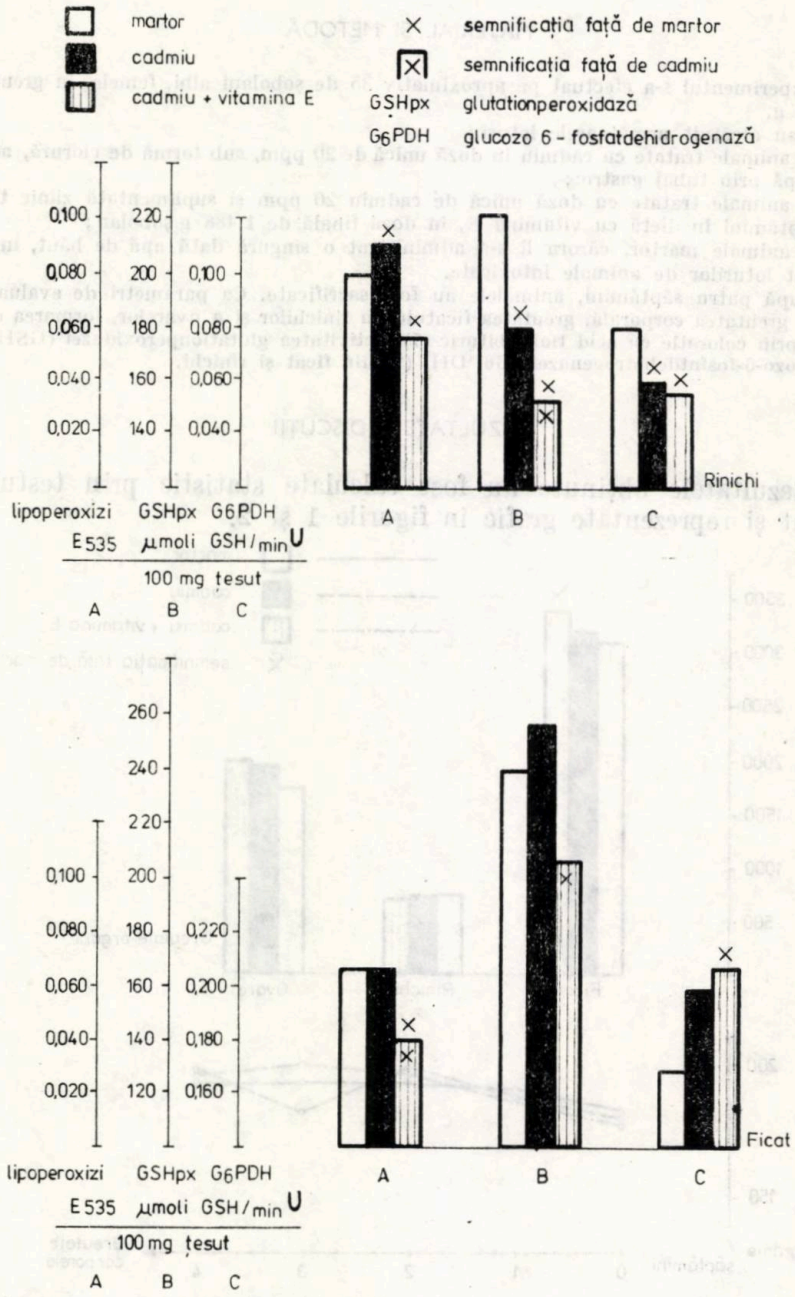


Fig. 2. — Variația parametrilor biochimici investigați în ficat și în rinichi la șobolan.

În ceea ce privește greutatea ficatului, a rinichilor și a ovarelor, nu se observă modificări semnificative față de martor, excepție făcînd ficatul animalelor tratate cu cadmiu în doză de 20 ppm și suplimentată cu vitamina E.

În ficat (fig. 2), formarea de lipoperoxizi tisulari la animalele tratate cu 20 ppm cadmiu este nemodificată semnificativ față de martor. O scădere semnificativă a lipoperoxizilor hepatici se observă la animalele tratate cu 20 ppm cadmiu și suplimentate cu vitamina E. Peroxizii celulari, care apar în procesele fiziologice normale, crescînd în procesele de îmbătrînire tisulară, scad semnificativ datorită acțiunii vitaminei E, relevînd rolul antioxidant al acesteia (2), (6).

Activitatea GSHpx rămîne nemodificată față de martor la animalele tratate cu cadmiu și cadmiu plus vitamina E. O ușoară stimulare a activității G6PDH-azei se observă la ambele loturi de animale, cărora li s-a administrat atît cadmiu în doză de 20 ppm ($t = 1,6$), cît și cadmiu asociat cu vitamina E ($p > 0,05$). Acest rezultat justifică probabil o cerință de NADPH necesar proceselor de detoxifiere hepatică solicitate în intoxicația cu cadmiu, ceea ce determină și o creștere semnificativă în greutate a ficatului la animalele tratate cu cadmiu și vitamina E, toxicitatea acestui metal în doză unică de 20 ppm fiind mult atenuată la nivel hepatic.

În rinichi (fig. 2) se observă o creștere a peroxidabilității tisulare, evidențiată printr-o creștere semnificativă a lipoperoxizilor la animalele tratate cu cadmiu în doză de 20 ppm. Datele din literatură (10), (11), (12), (13) confirmă toxicitatea specific renală a cadmiului, care se poate manifesta fie prin producerea de lipoperoxizi ca prim mecanism de acțiune (3), fie prin alte mecanisme. Formarea de lipoperoxizi în exces este împiedicată semnificativ prin administrarea concomitentă a cadmiului cu vitamina E. Acest fapt evidențiază efectul antioxidant al vitaminei E, împiedicînd procesele de peroxidare a lipidelor celulare declanșate de cadmiu în rinichi, efect menționat și de alți autori în cazul acțiunii toxice a altor metale grele, ca plumbul (2).

La animalele tratate cu o doză unică de cadmiu 20 ppm și cadmiu plus vitamina E, activitatea glutationperoxidazei în rinichi este inhibată semnificativ față de martor. Inhibiția GSHpx datorită cadmiului, evidențiată și de alți autori (14), se poate datora afinității crescute a cadmiului la grupările —SH, punînd în discuție formarea lipoperoxizilor printr-o inhibiție enzimatică. O scădere semnificativă a GSHpx prin suplimentarea cu vitamina E față de animalele tratate numai cu cadmiu (fig. 2) se explică prin acțiunea antioxidantă a vitaminei E, care împiedică formarea de lipoperoxizi renali în prezența cadmiului și, prin urmare, o solicitare redusă a activității GSHpx, enzimă cu rol în descompunerea peroxizilor formați în exces (6), (15), fenomen observabil și la nivelul ficatului.

Activitatea semnificativ scăzută a G6PDH-azei în rinichi la ambele loturi de animale tratate comparativ cu lotul martor sugerează existența și a altor mecanisme de acțiune toxică a cadmiului, *in vivo*, alături de peroxidare.

CONCLUZII

O doză unică de 20 ppm cadmiu acționează la nivel renal prin creșterea lipoperoxizilor, prin inhibarea activității GSHpx și a G6PDH-azei. Suplimentarea cu vitamină E în dietă are un efect reversibil asupra formării în exces de lipoperoxizi renali induși de cadmiu. Se pare că efectul antioxidant protector al vitaminei E nu se exercită prin calea enzimatică investigată, respectiv prin activarea GSHpx și a G6PDH-azei.

În ficat, cadmiul în doză de 20 ppm nu produce peroxizi celulari, nu inhibă GSHpx, dar stimulează ușor activitatea G6PDH-azei, ceea ce sugerează existența unor mecanisme de detoxifiere hepatică, care solicită creșterea NADPH. Suplimentarea cu vitamină E conduce la o scădere a peroxizilor celulari, confirmînd rolul antioxidant al acesteia.

Prezentat la redacție
la 15 februarie 1982

* *Institutul de igienă și sănătate publică Cluj-Napoca,*
** *Institutul medico-farmaceutic Cluj-Napoca,*
*** *Facultatea de biologie Cluj-Napoca*

THE PROTECTIVE ROLE OF VITAMIN E AGAINST INCREASED CADMIUM IN RAT

SUMMARY

The effects of cadmium (given intragastrically in a single dose of 20 ppm) as well as the protective action of vitamin E (administered daily in food at a final dose of 1,488 g/kg b.w.) were studied. Formation of liver and kidney lipid peroxides, glutathione-peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the organ weights were determined after 4 weeks of treatment.

The results show that in the liver, 20 ppm cadmium did not significantly change the investigated parameters as compared to the control. Supplementation with vitamin E in the presence of cadmium caused a significant decrease of lipid peroxides and a concomitant stimulation of G6P-dehydrogenase activity. This stimulation, barely visible in cadmium-treated animals, is supposed to be necessary for the processes of hepatic detoxification, with a possible increase of NADPH.

In the kidney, 20 ppm cadmium significantly enhanced the lipid peroxide levels and determined an inhibition of GSH-peroxidase and G6P-dehydrogenase activities. Vitamin E supplement limited the excess formation of renal lipoperoxides induced by cadmium.

BIBLIOGRAFIE

1. N.H. STACEY, C.D. KLAASSEN, J. Toxicol. Environm. Health, **7**, 149 (1981).
2. O.A. LEVANDER, Environm. Health Perspect., **29**, 115 (1979).
3. S. GABOR, Z. ANCA, E. BORDAS, în *Kadmium Symposium*, Jena, 1979, p. 170.
4. M. CHVAPIL, J. N. RYAN, Z. BRADA, Biochem. Pharmacol., **21**, 1097 (1972).

5. H.B. DEMOPOULOS, Federation Proc., **32**, 1903 (1973).
6. C.K. CHOW, Amer. J. Clin. Nutrit., **32**, 1066 (1979).
7. F. SERAFINI, C. CESSI, Med. Sperimentale, **118**, 371 (1968).
8. R. OLINESCU, S. NIȚĂ, Rev. roum. Biochim., **10**, 119 (1973).
9. H.U. BERGMEYER, K. GAWEHN, M. GRASSI, în H.U. BERGMEYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1970, p. 417.
10. M. WEBB, în *Kadmium Symposium*, Jena, 1979, p. 101.
11. G. KAZANTZIS, în *Kadmium Symposium*, Jena, 1979, p. 117.
12. Y. ITOKAWA, *Kadmium Symposium*, Jena, 1979, p. 122.
13. A. OSSIAN, A. KOVATS, N. SCHUSTER, *Simpozionul „Consecințele ecologice ale poluării cu metale"*, Sibiu, 1981, p. 70.
14. A.G. SPLITTGERBER, A.L. TAPPEL, Arch. Biochem. Biophys., **197**, 534 (1979).
15. P.B. McCAY, D.D. GIBSON, K.L. FONG, K.R. HORNBROOK, Biochem. Biophys. Acta, **431**, 459 (1976).

MODIFICĂRI CALITATIVE ŞI CANTITATIVE ALE PROTEINELOR HEPATICE ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE

Rezumat. Au fost caracterizate proteinele hepatice sub raport cantitativ şi calitativ, în condiţiile inducerii diabetului aloxanic. S-a evidenţiat o scădere semnificativă a proteinelor hepatice în diabetul aloxanic comparativ cu starea normală. Analiza proteinelor s-a efectuat prin fracţionarea cromatografică pe DEAE-celuloză prin spectrofotometrie în ultraviolete şi prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. În diabetul aloxanic au fost evidenţiate unele modificări ale proteinelor hepatice care sînt în concordanţă cu alte modificări biochimice constante în diabetul aloxanic şi zaharat.

Progresul cercetărilor de diabetologie a relevat interrelaţiile dintre diferitele metabolisme şi a condus la reconsiderarea semnificaţiei unor indicatori biochimici.

Ficatul reprezintă organul de convergenţă al întregului metabolism intermediar, precum şi al celui hormonal. În acest context, diabetul zaharat şi cel experimental pot induce anumite modificări biochimice la nivelul acestui organ. Astfel, în lucrări anterioare au fost prezentate unele aspecte ale metabolismului proteic, ca de altfel şi ale activităţii unor enzime implicate în metabolismul glucidic (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9).

Pornind de la premisa că în diabetul aloxanic biosinteza acizilor nucleici este afectată (8), fapt care se repercutează asupra biosintezei proteinelor, în această lucrare ne-am propus ca obiectiv caracterizarea proteinelor hepatice în condiţiile inducerii diabetului aloxanic. Scopul acestor cercetări a fost stabilirea dacă şi, eventual, în ce măsură diabetul aloxanic induce anumite modificări cantitative şi calitative la nivelul acestor proteine, ca efect al administrării aloxanului, asupra metabolismului hepatic.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe două loturi de şobolani masculi din rasa Sprague-Dowley, în vîrstă de 6—8 luni, cu o greutate cuprinsă între 225 şi 335 g : un lot normal (5 şobolani) şi un lot căruia i-a fost administrat aloxan (5 şobolani). Ambele loturi au fost menţinute la un regim alimentar identic.

Inducerea diabetului aloxanic, verificarea stării diabetice, sacrificarea animalelor, prelevarea ficatului şi omogenizarea sa au fost prezentate în lucrări anterioare (1), (2). Din supernatantul obţinut în urma centrifugării omogenatului, s-au dozat proteinele la $\lambda = 280$ nm, folosindu-se spectrofotometrul VSU-2P. Pentru fracţionarea proteinelor din acelaşi supernatant, s-au introdus 2,5 ml într-o coloană cu DEAE-celuloză (provenită de la firma Serva Entwicklungs Heidelberg), ataşată la un separator automat de fracţiuni tip LKB, prevăzut cu sistem de înregistrare. Coloana cromatografică, avînd 36 cm înălţime şi 2,5 cm diametrul interior, a fost umplută cu DEAE-celuloză sub presiune hidrostatică, realizată de o coloană

de lichid înaltă de 155 cm, şi a fost echilibrată cu tampon TRIS-HCl pH 7,4, cu care s-a efectuat ulterior fracţionarea. Separatorul automat de fracţiuni a fost reglat la 42 de picături pentru fiecare probă, realizîndu-se un debit de 10—20 secunde/picătură ; în total s-au colectat 200 de probe.

Fracţiunile proteice reţinute pe coloană au fost eluate cu tampon TRIS-HCl pH 7,4 în gradient de concentraţie de NaCl între 0 şi 1,5 M ; gradientul de concentraţie al tamponului a fost între 0,04 şi 0,2 M. Eluarea s-a realizat prin utilizarea unui dispozitiv format din două vase, cu capacitatea de 500 ml, care comunicau între ele. În primul vas s-au introdus 500 ml TRIS 0,2 M + NaCl 1,5 M, iar în cel de-al doilea, care făcea legătura cu coloana de separare, 500 ml tampon TRIS-HCl 0,04 M de pH 7,4.

Înălţimea de scurgere a eluantului faţă de coloana de separare a fost de 55 cm. Evaluarea fracţiunilor separate s-a realizat la înregistratorul automat şi, respectiv, la spectrofotometrul VSU-2P (8). Fracţiunile majore obţinute prin cromatografie au fost analizate ulterior prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (10).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile medii statistice şi abaterile standard ale mediei concentraţiei proteinelor hepatice pentru lotul normal şi cel diabetic sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Concentraţia proteinelor totale hepatice în stadiul normal şi cu diabet aloxanic

Probe analizate	Ficat lot normal $\bar{X} \pm Sm$	Ficat lot cu diabet aloxanic $\bar{X} \pm Sm$	Testul Student
Proteine totale (g%)	25,5 ± 0,78	22,1 ± 0,39	3,87 ; $p<0,01$
Nivel procentual	100%	86,66%	—

Din analiza rezultatelor se constată că nivelul proteinelor hepatice scade semnificativ în condiţiile inducerii diabetului aloxanic. Procentual, nivelul proteinelor hepatice în starea cu diabet experimental scade pînă la 86,66%, faţă de nivelul proteinelor hepatice în starea normală. Această constatare se corelează cu nivelul acizilor nucleici, care scade în diabetul aloxanic pînă la 82,22% în raport cu starea normală (11).

Este cunoscut faptul că insulina stimulează sinteza de acizi nucleici, ca şi încorporarea aminoacizilor în proteinele ce se biosintetizează la nivel ribozomal (12). Pe de altă parte, diminuarea secreţiei de insulină, caracteristică diabetului zaharat şi experimental, şi modificarea consecutivă a raportului insulină/glucagon antrenează acţiuni de tip glucagonic asociate cu favorizarea catabolismului proteic. Acest fapt este în concordanţă cu creşterea concentraţiei plasmatice a aminoacizilor liberi totali şi cu hiperaminoaciduria, evidenţiată experimental în diabetul zaharat uman (13), precum şi cu creşterea concentraţiei plasmatice de aminoacizi, constatată în diabetul aloxanic (4).

Analiza cromatografică prin schimb ionic a proteinelor hepatice relevă un grad înalt de eterogenitate, evidenţiindu-se 27 de fracţiuni în cazul ficatului în stare normală şi 22 de fracţiuni în cazul ficatului provenit

de la şobolanii la care s-a provocat diabet aloxanic. Rezultatele analizei cromatografice sînt prezentate în figurile 1 şi 2.

Profilul cromatografic în ambele cazuri se poate delimita în şapte zone distincte, constituite din tipuri similare de proteine. Repartizarea fracţiunilor proteice în cadrul acestor zone este redată în tabela 2.

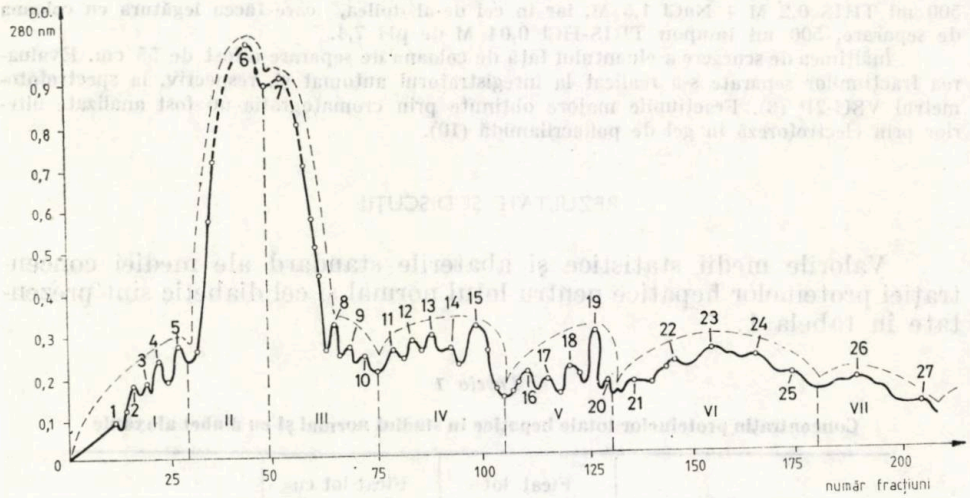


Fig. 1.— Diagrama de fracţionare pe DEAE-celuloză a proteinelor din ficat în condiţii normale.

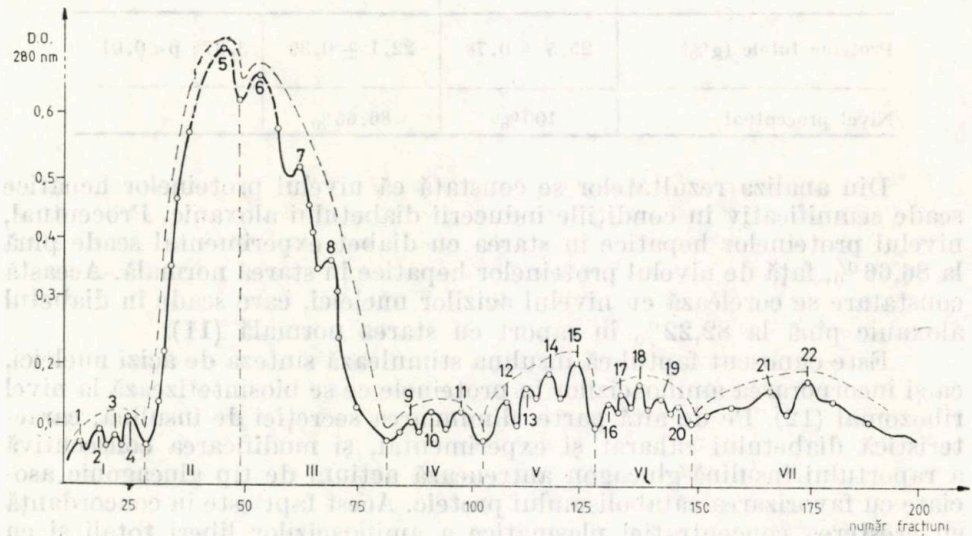


Fig. 2. — Diagrama de fracţionare pe DEAE-celuloză a proteinelor din ficat în condiţii de diabet aloxanic.

Din analiza acestor date rezultă că numărul de fracţiuni proteice separate este mai mic în cazul ficatului provenit de la şobolani cu diabet aloxanic, diferenţele faţă de ficatul normal înregistrîndu-se în zonele I,

Tabela 2

Repartizarea fracţiunilor proteice pe cele şapte zone cromatografice

Zone cromatografice	I	II	III	IV	V	VI	VII	Total fracţiuni
Ficat lot normal	5	1	4	5	5	5	2	27
Ficat lot cu diabet aloxanic	4	1	3	3	4	5	2	22

III, IV şi V. Pe de altă parte, se constată că unele fracţiuni proteice prezintă amplitudini mai mari decît cele din ficatul normal, iar altele, dimpotrivă, amplitudini mai mici decît cele de referinţă. Acest fapt poate fi corelat cu observaţia experimentală că la anumite enzime hepatice se constată o inhibiţie a lor (1), (2), (3), (7), iar la altele o activitate crescută, ca urmare a unei biosinteze accentuate (2), (5), (6).

În zonele II şi III sînt eluate două fracţiuni majore, care reprezintă principalul grup proteic eluat în condiţiile noastre de lucru. Zonele II şi III prezintă un grad de eterogenitate mai mic decît restul zonelor. Fracţiunile cromatografice constituind zonele II şi III au fost analizate electroforetic în gel de poliacrilamidă. Rezultatele acestei analize sînt prezentate în figura 3.

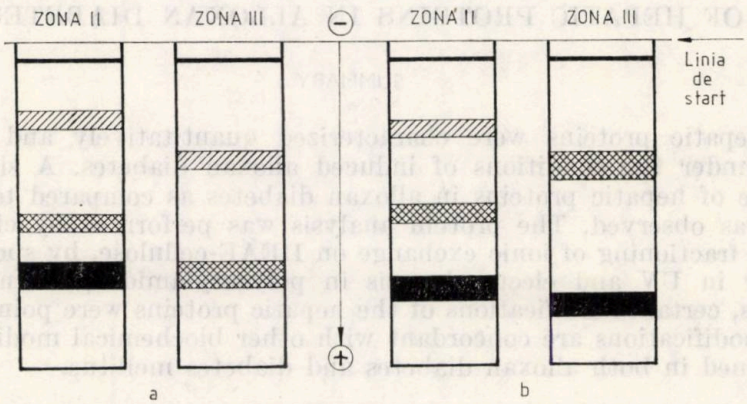


Fig. 3. — Diagrama electroforezei în gel de poliacrilamidă a proteinelor din zonele II şi III la ficatul normal (*a*) şi la cel în condiţii de diabet aloxanic (*b*).

Zona II indică, atît la ficatul normal, cît şi la cel în condiţii de diabet aloxanic, acelaşi număr de fracţiuni, cu mobilităţi electroforetice distincte. Zona III prezintă trei fracţiuni electroforetice; în cazul diabetului aloxanic se constată însă unele diferenţe sub aspect cantitativ şi calitativ, şi anume creşte mobilitatea electroforetică a fracţiunii cu migrarea cea mai rapidă.

Rezultă astfel că în diabetul aloxanic se produc anumite modificări cantitative şi calitative la nivelul proteinelor hepatice, care sînt în concordanţă cu alte modificări biochimice semnalate de noi în lucrări anterioare.

CONCLUZII

1. În diabetul aloxanic, concentrația proteinelor hepatice scade semnificativ față de nivelul concentrației proteinelor hepatice în condiții normale.

2. Spectrul proteic hepatic, relevat cromatografic și prin absorbția în ultraviolete a fracțiunilor individualizate, a fost delimitat în șapte zone distincte, constituite din tipuri similare de proteine.

3. În cazul ficatului animalelor aloxanizate, numărul de fracțiuni proteice, repartizarea pe cele șapte zone și amplitudinea lor diferă față de stadiul normal.

4. Caracterizarea electroforetică în gel de poliacrilamidă a zonelor II și III a scos în evidență, în stadiul diabetic față de stadiul normal, o mobilitate electroforetică crescută și o intensificare a fracțiunilor majore.

5. Această observație este în deplină concordanță cu constatările experimentale că la nivelul ficatului anumite enzime sînt inhibate, iar altele activate, ca rezultat al unei biosinteze accentuate.

Prezentat la redacție
la 5 aprilie 1982

Facultatea de medicină, Craiova,
Disciplina de biochimie

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE MODIFICATIONS OF HEPATIC PROTEINS IN ALLOXAN DIABETES

SUMMARY

Hepatic proteins were characterized quantitatively and qualitatively under the conditions of induced alloxan diabetes. A significant decrease of hepatic proteins in alloxan diabetes as compared to normal state was observed. The protein analysis was performed by chromatographic fractioning of ionic exchange on DEAE-cellulose, by spectrophotometry in UV and electrophoresis in polyacrylamide gel. In alloxan diabetes, certain modifications of the hepatic proteins were pointed out; these modifications are concordant with other biochemical modifications determined in both alloxan diabetes and diabetes mellitus.

BIBLIOGRAFIE

1. V. DARIE, M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., **22**, *1*, 11 (1979).
2. V. DARIE, M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., **22**, *2*, 133 (1979).
3. V. DARIE, D. TĂNĂSESCU, An. Univ. Craiova, Seria Șt. med., **V**, 111 (1980).
4. V. DARIE, M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., **23**, *2*, 135 (1980).
5. V. DARIE, M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., **24**, *1*, 57 (1981).
6. V. DARIE, M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., **24**, *2*, 157 (1981).
7. V. DARIE, D. TĂNĂSESCU, An. Univ. Craiova, Seria Șt. med., **VI**, 113 (1981).
8. V. DARIE, teză de doctorat, București, 1979.
9. E. A. PETERSON, H. A. SOBER, *Methods in enzymology*, sub red. S.P. COLOWICK și N. O. KAPLAN, Academic Press, New York, vol. V, 1962.
10. D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVAN, St. cerc. biochim., **13**, *3*, 313 (1968).
11. V. DARIE, C. NEDELCU, An. Univ. Craiova, Seria Șt. med., **II**, 119 (1977).
12. K. OBERDISSE, *Diabetes mellitus*, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1975.
13. V. DARIE, V. SFÎRLEAZĂ, Acta diabetologica romana, **2**, *5—6*, 426 (1976).

MICROMETODĂ PENTRU STABILIREA CONŢINUTULUI ÎN ALCALOIZI LA CALUSUL DE *PAPAVER SOMNIFERUM* L.

Á. GYÉRESY*, I. BĂRA**, G. RÁCZ*

Rezumat. Calusul de *Papaver somniferum* L. s-a obţinut prin trecerea plăntuţelor în vîrstă de 2—3 zile, preparate în condiţii sterile, pe mediu de cultură cu agar.
Analizele pentru identificarea alcaloizilor s-au efectuat atît pe calus, cît şi pe mediul de cultură, printr-o micrometodă cromatografică originală.
Nu s-au identificat alcaloizi în nici una dintre probele analizate.

Alcaloizii cei mai importanţi din *Papaver somniferum* L., morfina şi noscapina, se obţin prin extracţie din capsulele plantei. Codeina se prepară prin metilarea morfinei (semisinteză), iar papaverina prin sinteză totală. În prezent se investighează posibilitatea obţinerii celor doi alcaloizi nu atît din materia primă vegetală, în general deficitară (cantitatea disponibilă este insuficientă şi conţine de obicei morfină în procent prea mic), ci prin realizarea de culturi de ţesuturi în care biogeneza să fie dirijată spre a se asigura materia primă în flux continuu. Este posibil ca noua metodă să devină mai rentabilă decît culturile convenţionale de mac în cîmp.

În intenţia de a ne aduce contribuţia la cunoaşterea cît mai în detaliu a biologiei speciei *P. somniferum* şi de a îmbogăţi arsenalul metodelor de ameliorare a calităţilor sale bioproductive, am iniţiat culturi de ţesuturi, pe care am investigat biosinteza alcaloizilor şi procesul organogenezei. Principalul scop al prezentei lucrări l-a constituit punerea la punct a unei micrometode de identificare a conţinutului de alcaloizi în mediul de cultură şi, respectiv, în calus.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

Pentru inducerea calusării am folosit mediile de cultură (cu agar) după reţetele indicate de Gamborg şi colab. (1) şi Gamborg (2). Materialul biologic a constat din seminţe de *Papaver somniferum*, menţinut în cultură timp de cinci ani pe lotul experimental al Staţiunii „Stejarul" şi supus selecţiei individuale după criteriul conţinutului ridicat de morfină.

Seminţele au fost imersate timp de 15—20 de minute în hipoclorit de Na 5% pentru sterilizare şi puse la germinat în flacoane Erlenmeyer pe hîrtie de filtru îmbibată cu apă distilată (ambele sterile).

După germinare, plăntuţele, care aveau 0,5—1 cm, au fost transferate pe mediu. Toate operaţiunile s-au efectuat sub lampa de ultraviolete.

Calusarea debutează la 20—25 de zile după transferarea plăntuţelor pe mediul de cultură. Iniţial, plăntuţa se îngroaşă, se tumefiază puternic. Apoi, în diferite porţiuni apare calusul propriu-zis, de culoare alb-gălbuie. Ulterior, culoarea devine brună, cu insule alb-gălbui. Ritmul de creştere este de obicei slab. Se constată diferenţe minore între ritmul de creştere pe cele două medii, în sensul că pe mediul Gamborg (2) creşterea este puţin mai rapidă.

Cercetările noastre au avut ca rezultat elaborarea unei micrometode pentru identificarea alcaloizilor din mediul de cultură şi din calusul de *Papaver somniferum*.

Micrometoda de identificare a alcaloizilor din mediul de cultură

În prima fază se îndepărtează calusul de pe mediul de cultură. Apoi, mediul se lichefiază prin menţinerea flaconului pe baia de apă. Cînd mediul este lichefiat, se adaugă 100 ml apă distilată, preîncălzită pe baia de apă. Se lasă să se răcească, apoi se alcalinizează cu amoniac diluat şi se fac extracţii cu cloroform, de trei ori cu cîte 10, 5, 5 ml. Soluţiile cloroformice se filtrează prin sulfat de sodiu anhidru. Se evaporă la sicitate. După răcire, reziduul se dizolvă în 0,5 ml cloroform. Ceea ce se obţine reprezintă soluţia care serveşte pentru examenul cromatografic, după metoda Gyéresy şi Rácz (3).

În paralel, se pregătesc plăci cromatografice de 20 × 20 cm, acoperite cu strat absorbant de silicagel G. Din soluţia cloroformică se pipetează pe placă şi, după uscare, se pulverizează cu reactivul iodobismutit de potasiu (reactiv Dragendorff). În cazul în care alcaloizii sînt prezenţi, trebuie să apară o pată colorată în roşu-portocaliu pe fond galben. În continuare, pe placa cromatografică se aduc cantităţi crescînde de soluţie (20—40—60—80—100 µl), după care se lasă să se usuce zonele de aplicare.

Micrometoda de identificare a alcaloizilor din culturile de ţesuturi

Ţesuturile vegetale (calusul), separate cu o spatulă sau prin filtrarea mediului lichefiat printr-un tifon, se usucă între foi de hîrtie de filtru şi se cîntăresc. Rezultatul cîntăririi se notează cu P. În continuare se usucă în etuvă la 60—80°C. Reziduul uscat se cîntăreşte din nou (P_1), se pulverizează şi apoi se umectează cu 1 ml acid clorhidric 0,1 N. După 15 minute se adaugă 4 ml etanol şi se agită. Se lasă în repaus 30 de minute, cu agitare din timp în timp. Se filtrează şi se evaporă pe baia de apă. Reziduul se dizolvă în 0,5 ml etanol diluat (70°), acidulat cu două picături de HCl 0,1 N. Din soluţia extractivă se aplică pe o placă cromatografică spoturi cuprinse între 20 şi 100 µl. După uscare se eluează cu un sistem de solvenţi, format din acetonă : o-xilen-metanol : amoniac concentrat în proporţiile 50 : 40 : 6 : 5. În paralel se cromatografiază şi substanţe etalon, folosindu-se narceină, morfină, noscapină în soluţii etanolice 1% şi codeină, tebaină, papaverină în soluţii cloroformice 1%.

Identificarea alcaloizilor separaţi se face cu reactivul Dragendorff. Valorile de referinţă, orientative, ale alcaloizilor sînt următoarele: narceină 0,03—0,05, morfină 0,18—0,22, codeină 0,34—0,38, tebaină 0,58—0,62, papaverină 0,72—0,76, noscapină 0,82—0,86 (3).

REZULTATE

Întrucît cantitatea de calus acumulată într-un flacon, între două pasaje succesive, este destul de mică, spre a avea material suficient de analiză s-a cumulat conţinutul mai multor flacoane într-o singură variantă.

Prin determinarea greutăţii ţesuturilor proaspete (P) şi a ţesuturilor uscate (P_1), s-a calculat reziduul după uscare (P_u), în procente:

$$P_u = \frac{P_1}{P} 100$$

Rezultatele celor trei variante analizate sînt prezentate în tabela 1.

Examinîndu-se cromatografic soluţiile extractive obţinute din mediile de cultură, nu s-a putut pune în evidenţă prezenţa alcaloizilor.

Tabela 1

Cantitatea de substanţă uscată la variantele de calus analizate

Varianta	P(g)	P_1(g)	P_u(%)
V_1	0,2736	0,0220	8,04
V_2	1,4965	0,0855	5,71
V_3	2,3480	0,1300	5,53

În extractele de calus, numai la varianta 3 s-a identificat un component bazic, care s-a colorat cu reactivul Dragendorff, avînd un Rf superior noscapinei. Presupunem că acest component s-a format în cursul biogenezei, proces investigat de numeroşi autori (4), (5).

Prezentat la redacţie
la 20 mai 1982

* *I.M.F. — Tîrgu Mureş, 4300 Tîrgu Mureş, str. Gh. Marinescu, nr. 38*
şi
** *Staţiunea de cercetări „Stejarul", 5648 Pîngăraţi (jud. Neamţ)*

A MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF ALKALOIDS CONTENT IN *PAPAVER SOMNIFERUM* L. CALLUS

SUMMARY

The callus of *Papaver somniferum* was obtained from 2—3 days plants (grown in sterile conditions), passed on medium with agar.

The analyses for the identification of alkaloids were made both on the medium and on the callus by an original chromatographic micromethod.

No alkaloid has been noticed in the medium and in the callus.

BIBLIOGRAFIE

1. O. L. GAMBORG, R. A. MILLER, K. OJIMA, Exp. Cell. Res., **50**, 151(1968).
2. O. L. GAMBORG, *Callus and Cell Culture*, în *Plant Tissue. Culture Method*, vol. I, sub red. O. L. GAMBORG şi L. R. WETTER, NRCC, Saskatoon, Saskatchewan, 1975.
3. Á. GYÉRESY, G. RÁCZ, Revista med., Tîrgu Mureş, **XIX**, 49(1973).
4. G. BLASCHKE, Mitt. dtsch. Pharm. Ges., **39**, 225 (1969).
5. Z. SZABÓ et al., Herba hung., **3**, 105 (1964).

DETERMINAREA SELECTIVĂ A α-AMILAZEI PRIN DIFUZIE RADIALĂ, UTILIZÎND AMILOZA RETICULATĂ (notă preliminară)

M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, T. BENŢIA

Rezumat. Amiloza reticulată constituie un substrat specific pentru α-amilază fără a fi substrat şi pentru exoamilaze (β-amilază, glucoamilază). Aplicînd probe de α-amilază şi de β-amilază în diferite concentraţii, se constată o dependenţă lineară a diametrelor zonelor de difuzie de valorile logaritmilor concentraţiilor de enzime în cazul α-amilazei pe plăcile cu amiloză şi amiloză reticulată şi în cazul β-amilazei pe placa ce conţine amiloză. Nu se constată activitate în cazul β-amilazei pe plăcile ce conţin amiloză reticulată. Limitele de detecţie în sistemul menţionat sînt comparabile cu cele ale metodelor difuzimetrice uzuale.

Metodelor de analiză biochimică bazate pe difuzia radială în geluri le este acordată în ultimul timp o atenţie mereu crescîndă, în special datorită faptului că pot fi utilizate în analize de serie în cadrul proceselor de triere preliminară (screening) în microbiologie, în analiza imunochimică (1), (2) şi în enzimologie pentru evidenţierea unor activităţi enzimatice (3), (4), (5) şi pentru determinarea semicantitativă a activităţilor unor enzime (6), (7), (8), (9).

Dozarea α-amilazei (EC 3.2.1.1) prin difuzie radială a constituit obiectul a numeroase preocupări (6), (7), (9), (10). Numărul relativ ridicat de lucrări apărute în acest domeniu este pe deplin justificat, avînd în vedere interesul deosebit acordat acestei enzime cu largi implicaţii în industria alimentară şi farmaceutică, în chimia şi biochimia preparativă, în cercetarea biomedicală, precum şi în chimia clinică, enzima fiind utilizată în diagnosticul unor maladii (11). Lucrările menţionate prevăd utilizarea ca substrat a amidonului solubil dispus în agar sau alt mediu de gelificare, de exemplu agaroza. Aplicarea metodei de difuzie radială în condiţiile uzuale permite determinarea enzimelor amilolitice în ansamblu (α-amilază, β-amilază, glucoamilază), care sînt înalt interferente (12), acţionînd asupra acelorași substrate, şi care deseori apar asociate în diferite surse biologice (13).

În lucrarea de faţă ne-am propus utilizarea amilozei şi amilozei reticulate ca substrate care permit determinarea selectivă a α-amilazei prin difuzie radială.

În lucrări anterioare (14)—(18) am arătat că amiloza reticulată constituie un substrat specific pentru α-amilază (endoamilază) fără a fi substrat pentru β-amilază şi glucoamilază (exoamilaze). Această comportare ne-a permis fie determinarea α-amilazei în prezenţa β-amilazei (14), (16) sau glucoamilazei (15), fie separarea prin cromatografie de afinitate pe o coloană de amiloză reticulată a α-amilazei de exoamilazele conta-

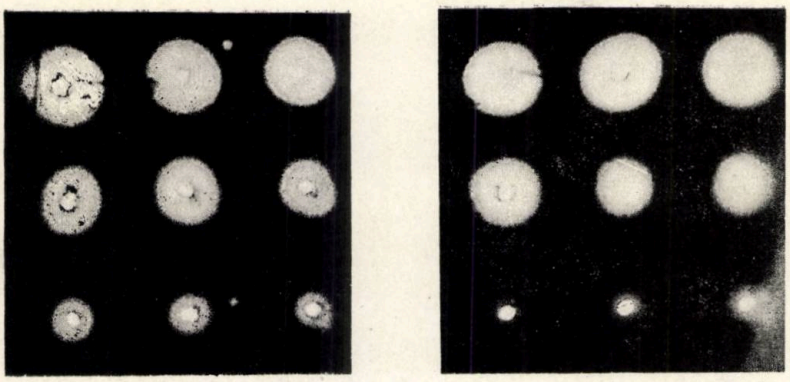


Fig. 1. — Difuzia α-amilazei în concentrații cuprinse între 0,003 și 1 mg/ml pe plăcile ce conțin amiloză (*a*) și amiloză reticulată (*b*).

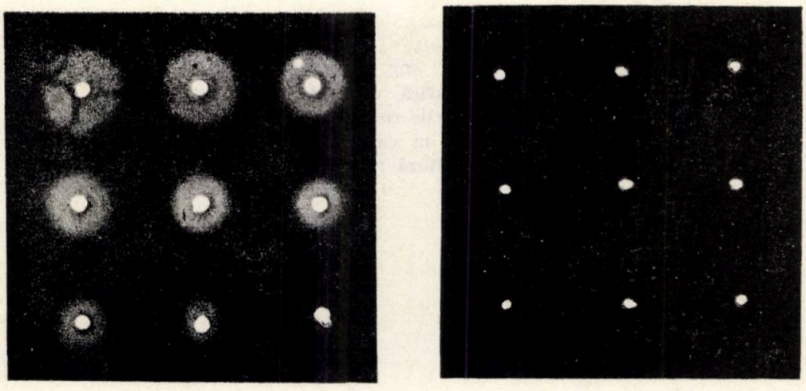


Fig. 2. — Difuzia β-amilazei în concentrații cuprinse între 0,001 și 0,3 mg/ml pe plăcile ce conțin amiloză (*a*) și amiloză reticulată (*b*).

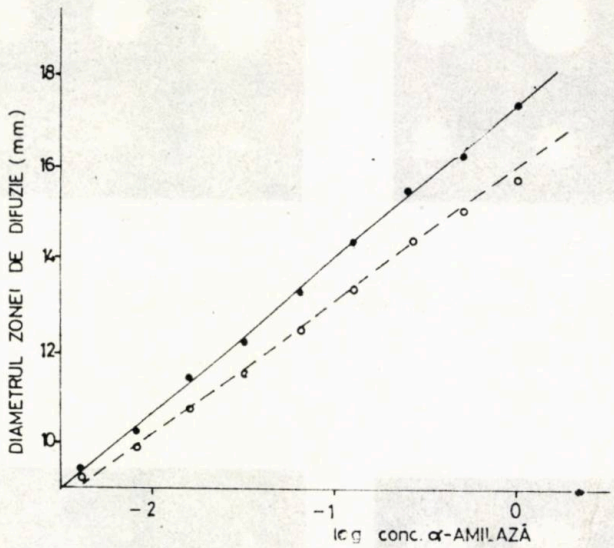


Fig. 3. — Reprezentarea grafică a diametrelor zonelor de difuzie în funcție de valorile concentrațiilor de α-amilază (în forma logaritmică) în cazul plăcilor ce conțin amiloză (●———●) și amiloză reticulată (o— — —o).

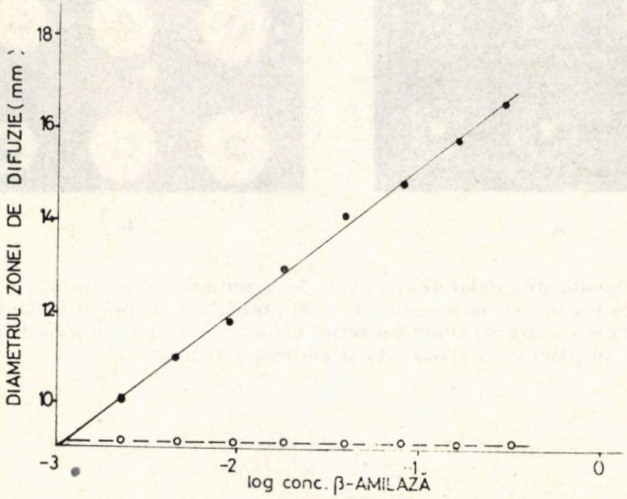


Fig. 4. — Reprezentarea grafică a diametrelor zonelor de difuzie în funcție de valorile concentrațiilor de β-amilază (în forma logaritmică) în cazul plăcilor ce conțin amiloză (● ——— ●) și amiloză reticulată (o — — — o).

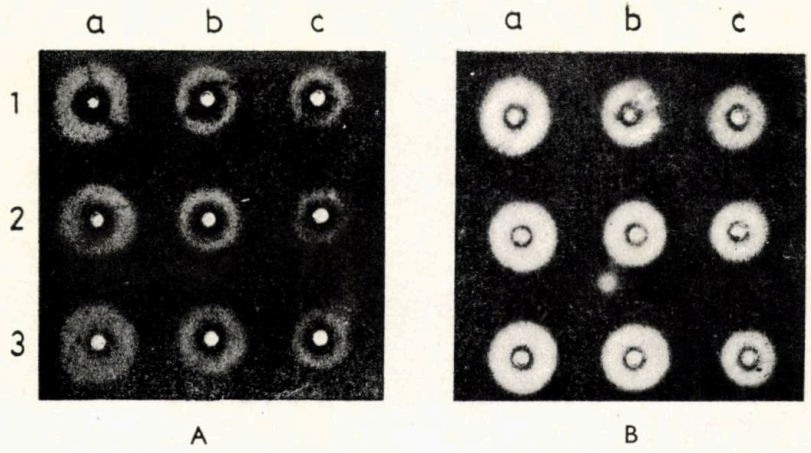


Fig. 5. — Influența diferitelor concentrații de α-amilază : 1 mg/ml (*a*), 0,5 mg/ml (*b*) și 0,25 mg/ml (*c*), în absența (*1*) și în prezența a 1 mg/ml albumină serică bovină (*2*) și a 2 mg/ml albumină serică bovină (*3*), asupra zonelor de difuzie în plăci cu amiloză (*A*) și amiloză reticulată (*B*).

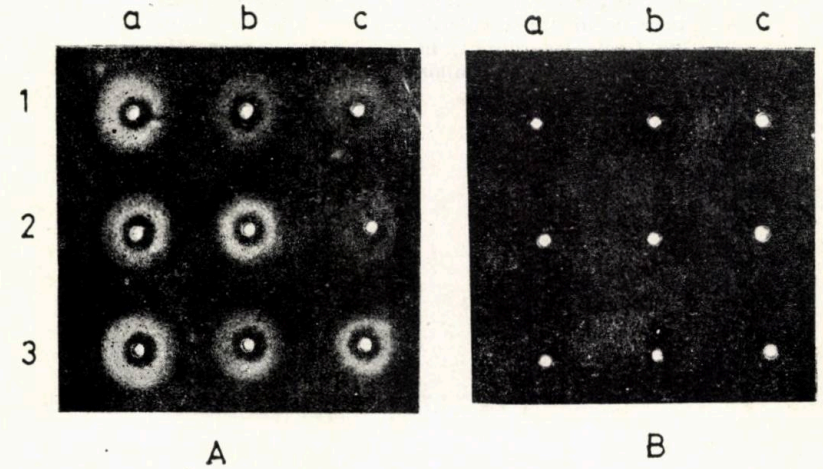


Fig. 6. — Influența diferitelor concentrații de β-amilază : 0,28 mg/ml (*a*), 0,14 mg/ml (*b*) și 0,07 mg/ml (*c*), în absența (*1*) și în prezența a 1 mg/ml albumină serică bovină (*2*) și a 2 mg/ml albumină serică bovină (*3*), asupra zonelor de difuzie în plăci cu amiloză (*A*) și amiloză reticulată (*B*).

minante (14), (18), cu rezultate concordante celor obținute de Weber și colab. (19).

Practic s-au utilizat α-amilază (Karl-Roth), β-amilază (Sigma), amiloză (Koch-Light) ca atare, nemodificată chimic, și amiloză reticulată cu epiclorhidrină (20).

Reticularea amilozei a fost efectuată în mediu alcalin în diverse variante, utilizîndu-se diferite raporturi amiloză/epiclorhidrină, în condiții descrise anterior (20), (21). S-au realizat astfel produsele amiloză X-10, amiloză X-50, amiloză X-90, amiloză X-100 și amiloză X-110[1], obținute în granulație fină și ulterior uscate prin deshidratare blîndă cu acetonă (22).

Gelurile pentru difuzie au fost preparate prin dispersarea omogenă a 1 g amiloză, respectiv 1 g amiloză reticulată în 100 ml soluție de agar 1%, încălzită la 60—70° C, la pH 6,5—6,8. Suspensia obținută a fost turnată pe plăci astfel încît să se realizeze o grosime uniformă a stratului de gel de 0,3 cm. S-au utilizat plăci (8 × 8 cm) cu godeuri avînd diametrul de 3,5 mm, pe care s-au aplicat probe a cîte 30 μl de α-amilază în concentrații de 0,003—1 mg/ml și, respectiv, de β-amilază în concentrații de 0,001—0,30 mg/ml.

Timpul de difuzie a fost de 20 de ore, în atmosferă umedă, la 25°C.

Colorarea gelurilor după difuzie a fost efectuată cu o soluție de iod 0,1 N.

Activitățile enzimatice specifice, determinate reductometric cu reactiv 3,5-dinitrosalicilic (23) utilizîndu-se o soluție de amidon 1% ca substrat, au fost de 20,4 μmoli maltoză eliberată/min/mg proteină în cazul α-amilazei și de 54,3 μmoli maltoză eliberată/min/mg proteină în cazul β-amilazei.

Imaginile plăcilor obținute după 20 de ore de difuzie a enzimelor în geluri și developarea cu soluția de iod 0,1 N sînt prezentate în figurile 1 și 2. După cum se constată, α-amilaza difuzează în condiții relativ asemănătoare atît în gelul ce conține amiloză, cît și în cel ce conține amiloză reticulată (amiloză X-100), în timp ce β-amilaza acționează în exclusivitate în gelul ce conține amiloză (substrat natural) fără a se constata activitate în cel ce conține amiloză reticulată, nici chiar atunci cînd pe plăci sînt aplicate concentrații relativ ridicate de β-amilază.

Reprezentînd grafic dependența diametrelor zonelor de difuzie în plăcile ce conțin amiloză și amiloză reticulată de activitățile α-amilazei în diferite concentrații (exprimate logaritmic), s-a constatat linearitate pe întreg domeniul de concentrații menționate (fig. 3). În ceea ce privește β-amilaza, dependența liniară a diametrelor zonelor de difuzie de valorile concentrațiilor exprimate logaritmic a fost constatată doar în cazul plăcilor care conțin amiloză (substrat natural), în timp ce în cazul plăcilor care conțin amiloză reticulată nu s-au observat zone de difuzie în urma reacției cu I_2, enzima fiind total inactivă față de acest substrat de semisinteză (fig. 4). Această comportare este explicabilă avînd în vedere faptul că acțiunea hidrolitică a β-amilazei (exoamilază) este blocată la nivelul punților glicerice transversale, introduse prin reticularea cu epiclorhidrină. Aceste punți intercatenare generează structuri asemănătoare punctelor de ramificare din structura amidonului, la nivelul cărora

[1] X indică faptul că amiloza este reticulată, iar cifra însoțitoare arată cantitatea de epiclorhidrină, în grame, utilizată la reticularea a 100 g amiloză.

activitatea β-amilazică este blocată. Rezultatele obţinute sînt în deplină concordanţă cu cele stabilite în lucrări anterioare (14), (18), în care s-a arătat că amiloza reticulată constituie un substrat doar pentru α-amilază, permiţînd astfel determinarea selectivă a acestei enzime.

Este cunoscut faptul că proteinele şi în anumite condiţii unii detergenţi prezintă efecte de activare a α-amilazei atunci cînd enzima este determinată prin metode analitice uzuale (24). Plecînd de la premisa că determinările activităţilor amilazice prin metoda difuzimetrică propusă trebuie să fie exacte, indiferent de compoziţia proteică a mediului de reacţie, am urmărit şi influenţa prezenţei altor proteine în mediu. Astfel, s-au supraîncărcat probe de α-amilază şi de β-amilază cu diferite cantităţi de albumină serică bovină. Practic s-au determinat diferite probe de α-amilază în concentraţii de 0,25—1 mg/ml în absenţa şi în prezenţa albuminei serice bovine în concentraţii de 1—2 mg/ml. În aceleaşi condiţii s-au determinat şi probele de β-amilază în concentraţii cuprinse între 0,07 şi 0,28 mg/ml. Aşa cum rezultă din figurile 5 şi 6, s-a constatat că supraîncărcarea cu albumină serică bovină nu generează nici un fel de modificări asupra activităţilor amilazice determinate difuzimetric, utilizînd substrate de amiloză şi amiloză reticulată, nici chiar în cazul în care concentraţia de albumină serică bovină a fost de opt ori mai mare decît concentraţia α-amilazei şi de 30 de ori mai mare decît concentraţia β-amilazei. Această constatare deschide perspectiva utilizării metodei difuzimetrice propuse pentru analize de serie chiar în cazul extractelor proteice totale, de exemplu în trierea tulpinilor producătoare de amilaze şi în analiza diferitelor lichide biologice.

În condiţiile utilizării amilozei X-100, limitele de detecţie ale metodei propuse (0,05 μg/probă) sînt comparabile cu cele ale altor metode de difuzie radială.

În cazul utilizării de amiloză reticulată cu reţele mai laxe sau mai dense, limitele de detecţie sînt mai mari, iar sensibilitatea metodei este mai redusă.

În note viitoare vor fi abordate probleme privind interferenţe ale glucoamilazei în determinarea difuzimetrică a α-amilazei, precum şi aspecte privind eventuala aplicabilitate clinică a metodei propuse.

Prezentat la redacţie
la 12 aprilie 1982

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de biologie moleculară,
77748 Bucureşti 17, Splaiul Independenţei nr. 296

SELECTIVE DETERMINATION OF α-AMYLASE BY RADIAL DIFFUSION USING CROSS-LINKED AMYLOSE (CL-AMYLOSE) (preliminary note)

SUMMARY

Cross-linked amylose was found to be a specific substrate for α-amylase only and not for exoamylases (β-amylase, glucoamylase). A linear dependence was established between the diffusion diameters and

the logarithmic values of α-amylase and β-amylase concentrations in the case of nonmodified amylose as substrate and in the case of β-amylase when amylose was used as substrate, only. No diffusion (activity) was established in the case of β-amylase using CL-amylose as substrate. The detection limits (0.05 μg/sample) in the described conditions are in the same range with some other diffusimetric methods.

BIBLIOGRAFIE

1. G. MANCINI, A. O. GARBONARA, I. F. HEREMANS, Immunochemistry, **2**, 235(1965).
2. C.A. RYAN, Anal. Biochem., **19**, 434(1967).
3. G. F. B. SCHUMACHER, J. Reprod. Med., **1**, 61(1968).
4. G.F.B. SCHUMACHER, J. Reprod. Med., **3**, 171(1969).
5. K. MOETTOLNEN, J. Sci. Food Agr., **21**, 261 (1970).
6. W.B. SCHILL, G.F.B. SCHUMACHER, Anal. Biochem., **46**, 502 (1972).
7. G.F.B. SCHUMACHER, W.B. SCHILL, Anal. Biochem., **48**, 9 (1972).
8. H. LOVENSTEIN, A. J. H. GILD, Anal. Biochem., **70**, 204 (1976).
9. C. MUȘOLAN, S. VASU, St. cerc. biochim., **20**, 209 (1977).
10. V. V. KORSUNOV, Prikl. Biol. Mikrobiol., **IX**, 877 (1973).
11. K.F. McGEENEY, *Isoamylase-S-type amylase and P-type amylase*, în *Pharmacia Diagnostics AB*, Uppsala (Suedia), 1980.
12. J.J. MARSHALL, Anal. Biochem., **37**, 466 (1970).
13. J. A. THOMA, J.E. SPRADLIN, S. DYGERT, în *The Enzymes*, sub red. R.D. BOYER, ed. a 3-a, vol. 5, Academic Press, New York, 1971, p. 115.
14. M.A. MATEESCU, H.D. SCHELL, F. MIHĂILESCU, I. CORNOIU, Biochimie, **58**, 875 (1976).
15. M.A. MATEESCU, I. CORNOIU, H.D. SCHELL, Anal. Letters, **13** (B18), 1567(1980).
16. M.A. MATEESCU, Biochimie, **60**, 535 (1978).
17. M.A. MATEESCU, St. cerc. biochim., **24**, 175 (1981).
18. H.D. SCHELL, M.A. MATEESCU, T. BENȚIA, A. JIFCU, Anal. Letters, **14** (B17 & 18), 1501 (1981).
19. M. WEBER, M.J. FOGLIETTI, F. PERCHERON, Biochimie, **58**, 1299(1976).
20. M. ȘERBAN, M.A. MATEESCU, H.D. SCHELL, Brevet R. S. România 61524/1976.
21. M. ȘERBAN, H.D. SCHELL, M.A. MATEESCU, Rev. roum. Biochim., **12**, 187 (1975).
22. V. GHEȚIE, H.D. SCHELL, Experientia, **27**, 1384 (1971).
23. J.F. ROBYT, W.J. WHELAN, Anal. Biochem., **45**, 510 (1972).
24. M.D. O'DONNELL, K.F. McGEENEY, Enzyme, **18**, 356 (1974).

CERCETĂRI PRELIMINARE ASUPRA COMPUŞILOR STEROIDICI DIN CULTURILE DE ŢESUTURI DIN FRUNZE DE *SOLANUM LACINIATUM* AIT.

ERSILIA MUNTEANU, VICTORIA CIURDARU, C. BODEA

Rezumat. Culturile de ţesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait., crescute pe mediul mineral Murashige-Skoog agarizat, suplimentat cu aminoacizi, vitamine, chinetină şi acid α-naftilacetic în varianta 1 sau cu acid 2,4-diclorfenoxiacetic în varianta 2, s-au dovedit capabile să sintetizeze *in vitro* compuşi steroidici. Analiza cromatografică pe strat subţire a extractelor cloroformice din ţesuturile de calus evidenţiază 7—9 pete principale; spectrul de pete este acelaşi, independent de vîrsta ţesutului şi de felul auxinei din mediu. În toate probele de calus cromatografiate se relevă prezenţa sterolilor şi a unui compus cu Rf identic cu al lanosterolului. Ceilalţi compuşi steroidici vizualizaţi prin reacţii de culoare specifice sînt probabil sapogenine.

Dintre plantele valoroase pentru conţinutul însemnat de steroide face parte şi *Solanum laciniatum* Ait., introdus în cultura *in vitro* în speranţa de a se păstra în aceste condiţii abilitatea de sinteză a acestor compuşi (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9). În culturile de ţesuturi de *Solanum laciniatum* Ait. a fost semnalată pînă în prezent sinteza sterolilor (2), (4), (5), a diosgeninei (2), (5), a lanosterolului (5) şi a altor compuşi consideraţi a aparţine grupei sapogeninelor (4). Într-un singur caz a fost menţionată prezenţa în aceste culturi a componentului steroidic major al plantei — alcaloidul solasodina (6).

În această lucrare se prezintă rezultatele analizei cromatografice pe strat subţire a compuşilor steroidici (steroli şi sapogenine) biosintetizaţi în culturile de ţesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait. realizate de noi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Culturile de ţesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait. analizate au fost subcultivate repetat timp de 102 săptămîni pe două variante de mediu, diferite doar prin natura auxinei, acidul α-naftilacetic (4 mg/l) în varianta 1, respectiv acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (1 mg/l) în varianta 2. S-a folosit mediul de cultură mineral Murashige-Skoog (10) agarizat, suplimentat cu vitamine (0,100 mg/l tiamină, 0,500 mg/l piridoxină, 0,500 mg/l acid nicotinic, 100 mg/l mioinozitol),), aminoacizi (2 mg/l glicină, 1 000 mg/l hidrolizat de cazeină), chinetină (1 mg/l) şi auxinele menţionate. Ca sursă de hidraţi de carbon s-a adăugat zaharoza (3%). Recipientele de cultură au fost menţinute în termostat cu lumină artificială la 25 ± 2°C, 700—1500 lucşi şi o umiditate relativă a aerului de circa 70%.

Calusul recoltat de pe cele două variante de mediu, uscat la 50°C şi apoi fin mărunţit prin măcinare şi mojarare, a fost reunit în vederea analizei sterolilor şi sapogeninelor pe două categorii de vîrstă, după cum rezultă din tabela 1.

Pentru analiza compușilor steroidici menționați s-a folosit metoda utilizată de Jain și colab. (11). Cîte 10 g calus sub formă de pulbere s-au extras în Soxhlet 24 de ore cu eter de petrol și apoi 8 ore cu benzen. Țesutul a fost uscat, repulverizat, supus hidrolizei acide cu HCl 10% și spălat pînă la un pH de aproximativ 5 al apelor de spălare. Pentru extracția sterolilor și a sapogeninelor, țesutul hidrolizat și spălat a fost uscat și pulverizat din nou, în vederea extracției cu cloroform timp de 48 de ore.

La analiza compușilor steroidici s-a folosit tehnica cromatografiei pe strat subțire, utilizîndu-se în acest scop plăci cu silicagel G (Merck), în grosime de 0,5 mm. Cromatografierea extractelor cloroformice s-a făcut alături de etaloane autentice de steroli (β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, colesterol), diosgenină, lanosterol; s-a efectuat de asemenea cocromatografierea extractelor cu diosgenină și steroli. Pentru developarea cromatogramelor s-au ales șapte sisteme de solvenți, dintre care patru sisteme corespunzătoare pentru separarea compușilor mai puțin polari, menționate în tabela 2, și alte trei sisteme de solvenți care s-au dovedit potrivite pentru separarea compușilor mai polari, menționate în tabela 3. Vizualizarea cromatogramelor s-a făcut prin stropire cu acid clorosulfonic, reactiv Liebermann-Burchard și acid fosfomolibdenic (12), toți reactivii indicînd același spectru de compuși.

Tabela 1

Probe de calus din frunze de *Solanum laciniatum* Ait.

Proba	Vîrsta calusului (săptămîni)	Varianta de mediu
1	pînă la 58	1
2	58—102	1
3	pînă la 58	2
4	58—102	2

Tabela 2

Valori Rf medii ale unor compuși steroidici mai puțin polari separați din calus de frunze de *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subțire de silicagel G comparativ cu unele probe autentice

Sistem de solvenți	Valori Rf medii ale principalilor compuși steroidici din calus	Valori Rf ale probelor autentice		
		diosgenină	steroli	lanosterol
Cloroform-acetat de etil (95 : 5)	0,27 0,38 0,50 0,65 0,73	0,38	0,50	0,65
Clorură de metilen-alcool metilic (97 : 3)	0,36 0,52 0,61 0,75	0,52	0,61	0,75
Clorură de metilen-acetat de etil (97 : 3)	0,13 0,17 0,25 0,31 0,50	0,17	0,31	0,50
Eter de petrol-benzen-acetat de etil (85 : 5 : 10)	0,12 0,28 0,49 0,85	0,17	0,28	0,49

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Investigațiile asupra compușilor steroidici din calusul de frunze de *Solanum laciniatum* Ait. evidențiază capacitatea acestui țesut de a sintetiza *in vitro* compuși steroidici.

Analiza cromatografică pe strat subţire a probelor studiate indică acelaşi spectru de compuşi steroidici la calusul dezvoltat pe cele două variante de mediu diferind prin natura auxinei, spectru care se menţine de asemenea neschimbat la probele de calus de vîrste diferite.

Valorile Rf medii ale compuşilor evidenţiaţi prin cromatografiere utilizînd cele şapte sisteme de solvenţi sînt redate în tabelele 2 şi 3.

Tabela 3

Valori Rf medii ale unor compuşi steroidici mai polari separaţi din calus de frunze de *Solanum laciniatum* Ait. prin cromatografie pe strat subţire de silicagel G

Sistem de solvenţi	Valori Rf medii ale principalilor compuşi steroidici din calus
Eter etilic-alcool metilic-benzen (9 : 1 : 10)	0,03 0,11 0,36
Cloroform-alcool metilic (19 : 1)	0,07 0,21 0,44
Benzen-acetonă (2 : 1)	0,06 0,20

Cromatogramele developate cu sistemele de solvenţi A, B, C şi D au arătat că din toate probele de calus din frunze analizate se separă o pată ce corespunde ca Rf probelor autentice de β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, colesterol, compuşi care nu pot fi separaţi cromatografic în sistemele menţionate, dînd pată unitară. Cromatografierea extractelor cloroformice din calus cu amestecul celor patru steroli relevă de asemenea că extractele de calus din frunze conţin steroli, compuşi raportaţi ca prezenţi în culturile de ţesuturi ale acestei plante de către Vágújfalvi şi colab. (2), Supniewska şi Dohnal (3), Hosoda şi Yatazawa (5).

Tot în cadrul compuşilor mai puţin polari se evidenţiază în toate variantele de cromatografiere un compus cu Rf identic cu al lanosterolului, triterpenoid detectat de asemenea de Hosoda şi Yatazawa (5) în aceste culturi.

Dintre sistemele de solvenţi A, B, C şi D, numai sistemele A, B şi C separă din extractele cloroformice analizate o pată corespunzătoare ca Rf diosgeninei. Aceasta rezultă şi din cocromatografierea cu diosgenină autentică. Prezenţa diosgeninei, semnalată în culturile de ţesuturi de *Solanum laciniatum* Ait. de către Vágújfalvi şi colab. (2) şi de către Hosoda şi Yatazawa (5), în calusul din frunze analizat de noi rămîne totuşi incertă.

Menţionăm totodată faptul că pe toate cromatogramele apare drept component major al probelor analizate un compus de polaritate medie, cu Rf inferior celui al diosgeninei.

Prin tehnici mai perfecționate și prin aparatură de rezoluție înaltă se va urmări posibilitatea identificării sterolilor din culturile de țesuturi de *Solanum laciniatum* Ait. și a celorlalți compuși detectați, probabil aparținînd grupei sapogeninelor.

CONCLUZII

1. Culturile de țesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait. sînt capabile să sintetizeze *in vitro* compuși steroidici.

2. Analiza cromatografică pe strat subțire evidențiază un spectru larg de compuși de natură steroidică, dintre care cel puțin un sterol sau amestec de steroli, un compus cu valoare Rf identică cu cea a lanosterolului și probabil mai multe sapogenine.

3. În culturile de țesuturi din frunze de *Solanum laciniatum* Ait., biosinteza steroidelor nu pare legată de vîrsta țesutului și nici de natura celor două auxine din mediul de cultură.

Prezentat la redacție
la 29 ianuarie 1982

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
3400 Cluj-Napoca

PRELIMINARY STUDIES ON THE STEROID COMPOUNDS IN LEAF-TISSUE CULTURES OF *SOLANUM LACINIATUM* AIT.

SUMMARY

The leaf-tissue cultures of *Solanum laciniatum* Ait. grown on Murashige-Skoog mineral medium solidified with agar, enriched with amino acids, vitamins, kinetin and α-naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, are able to synthesize steroid compounds. TLC examination of chloroformic extracts from callus tissues reveals 7—9 main spots; independent of the age of calluses or the auxin from medium, the spots spectrum is the same. All chromatograms show a clear spot for sterols and one with Rf-value corresponding to lanosterol. The other steroid compounds, detected by specific color-reaction on chromatograms, are probably sapogenins.

BIBLIOGRAFIE

1. J. ŘERÁBEK, Biol. Plant., **9**, 285 (1967).
2. D. VÁGÚJFALVI, M. MAROTI, P. TETÉNYI, Phytochemistry, **10**, 1389 (1971).
3. J.H. SUPNIEWSKA, B. DOHNAL, Dissert. Pharm. Pharmacol., **24**, 187 (1972).
4. J.H. SUPNIEWSKA, B. DOHNAL, Dissert. Pharm. Pharmacol., **24**, 193 (1972).
5. N. HOSODA, M. YATAZAWA, Agric. Biol. Chem., **43**, 821 (1979).
6. N. HOSODA, H. ITO, M. YATAZAWA, Agric. Biol. Chem., **43**, 1745 (1979).
7. E. MUNTEANU, M. FLORESCU, Probleme de genetică teoretică și aplicată, **VIII**, *3*, 131 (1976).
8. E. MUNTEANU, Bul. Inst. agron., Cluj-Napoca, **30**, 41 (1976).
9. E. MUNTEANU, Bul. Inst. agron., Cluj-Napoca, **32**, 93 (1978).
10. T. MURASHIGE, F. SKOOG, Physiol. Plant., **15**, 473 (1962).
11. S.C. JAIN, H. ROSENBERG, S.J. STOHS, Planta medica, **31**, 109 (1977).
12. * * * *Reagents MERCK: Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, 1974.

MECANISME BIOCHIMICE IMPLICATE ÎN ACŢIUNEA FARMACODINAMICĂ A PROPOLISULUI. I. ACŢIUNEA *IN VITRO* ASUPRA ALBUMINEI ŞI PROTEINELOR SERICE

R. OLINESCU, T. GIDOIU, T. SAFTA, E. POPESCU

Rezumat. Prin studii de absorbţie şi determinări chimice s-a constatat că preparatul de propolis purificat conţine cantităţi mari de flavonoizi şi proteine, prezentîndu-se o tentativă de etalonare. Preparatul de propolis purificat poate acţiona ca agent denaturant, producînd deconformaţionări ale serumalbuminei purificate, observabile prin modificarea absorbţiei la 280 nm şi prin eliberarea grupărilor SH (sulfhidril) datorită expunerii unor noi lanţuri polipeptidice. Aceleaşi modificări s-au observat şi în urma incubării serumproteinelor recoltate de la om cu concentraţii variabile de propolis, în plus găsindu-se o activitate crescută a ceruloplasminei. Pe baza datelor prezentate se discută eventualele mecanisme implicate în acţiunea terapeutică a propolisului.

Propolisul, amestec complex de substanţe, cules şi secretat de albine în scop bactericid, conţine în general 55% substanţe răşinoase, 10% uleiuri volatile, 30% ceruri şi 5% polen. Acţiunea sa terapeutică este cunoscută din vechime, dar abia în ultimii ani propolisul este folosit clinic ca bactericid în stomatologie, chirurgie, dermatologie, oftalmologie sau în tratamentul astmului, colitei etc. (1), (2), (3). Acţiunea farmacodinamică a propolisului nu este încă elucidată. Nu este cunoscută nici proprietatea sa bactericidă, evidentă, care poate fi atribuită fie unor antibiotice (4), fie conţinutului bogat în flavonoizi (5), cu atît mai mult cu cît propolisul este eficient faţă de o gamă largă de bacterii, virusuri, fungi etc. (1)—(3).

Cunoaşterea mecanismelor implicate în acţiunea farmacodinamică a propolisului ar permite utilizarea lui terapeutică pe o scară mai largă şi mai eficientă. Deşi studiul acestor mecanisme a fost larg investigat (1)—(3), majoritatea lucrărilor atestă stimularea nespecifică a unor sisteme imunologice, iar biochimic nu se cunosc încercări de formulare a unor mecanisme metabolice, ci doar unele determinări analitice (6).

MATERIAL ŞI METODE

S-a utilizat propolis purificat şi liofilizat, furnizat de către Institutul naţional de cercetări pentru apicultură şi apiterapie. Principala dificultate în acceptarea farmacologică a propolisului constă în complexitatea mare a acestui produs. Deoarece nu există etaloane, prezentăm o tabelă de caracterizare calitativă şi cantitativă drept criteriu de reproductibilitate.

Din determinările prezentate în tabela 1 rezultă că preparatul de propolis purificat conţine o gamă largă de flavonoizi, care reacţionează variat, în funcţie de natura şi de proporţia lor. Trebuie să remarcăm un conţinut în proteine încă necaracterizate. Faţă de propolisul secre-

tat de albine, preparatul purificat este mult mai bogat în proteine datorită tratamentului de purificare, care a permis o îmbogățire în detrimentul fracțiunilor cu conținut mare în rășini și ceruri.

Tabela 1

Caracterizarea chimică a soluției apoase 1 mg/ml propolis purificat*

Reacții	Valori (mg)	Semnificație
$FeCl_3$	0,30	catechine
Reactiv Folin-Denis	0,24	catechine
Vanilină– H_2SO_4	0,31	catechine
NaOH 4 N	0,63	catechine + flavone
$Abs_{287} \times E^{1\%}_{1cm}$ (2)	0,67	flavonoizi
$AlCl_3$	0,18	flavone
Ninhidrină	negativ	aminoacizi
Metoda Lowry (10)	0,12	proteine
Orcinol, difenilamină	negativ	acizi nucleici

* Reacțiile caracteristice flavonoizilor (7) au fost efectuate spectrofotometric pe bază comparativă : catechină pentru taninuri catechinice și rutin pentru flavone. Soluția apoasă de propolis a fost preparată chiar în ziua determinărilor.

Serul uman a fost obținut de la Spitalul Fundeni și provine de la pacienți fără boli de ficat sau neoplazii. Reacțiile caracteristice flavonoizilor au fost efectuate după tehnicile clasice (7). Grupările SH libere au fost determinate cu reactivul specific DTNB (acid 5,5′-ditiobenzoic) după Olinescu și Mărgineanu (8), iar activitatea ceruloplasminei după Ravin (9), folosindu-se p-fenilendiamină ca substrat. Pentru studiile de scanning s-a folosit un spectrofotometru Pye-Unicam SP-800.

REZULTATE

Unele proprietăți ale propolisului purificat

Datorită complexității compoziției propolisului purificat, a fost necesară o caracterizare suplimentară față de datele prezentate în tabela 1. Astfel, în figura 1 sînt redate absorbțiile în vizibil și ultraviolet ale soluțiilor de propolis purificat în apă și în tampon fosfat.

Din figura 1 se observă că în zona cercetată a spectrului de absorbție se evidențiază un maxim între 280 și 340 nm, format din cel puțin două grupe de substanțe : unul cu absorbție maximă în jur de 287 nm, care poate fi datorat taninurilor catechinice (tip catechină), unor flavonoizi (tip rutin) și proteinelor, și al doilea grup cu absorbție maximă în jur de 320 nm, care cuprinde o gamă largă de compuși aromatici, ca acizii cinamic, cafeic etc. Ținînd seama de datele prezentate în tabela 1, propolisul purificat conține mai ales flavone, taninuri catechinice și compuși cu nucleu benzenic. Problema prezenței proteinelor este discutabilă, datorită posibilei interferențe a altor compuși (catechine). În favoarea prezenței proteinelor sînt determinările prin metode chimice (Lowry (10) și biuret), absorbția la 280 nm cu valori de același ordin de mărime, precum și posibilitatea existenței unui conținut redus în grupări SH (fig. 2), provenite

probabil din expunerea unor resturi de cisteină. Existenţa proteinelor ar explica producerea unor alergii prin tratament cu propolis (1), (2). De

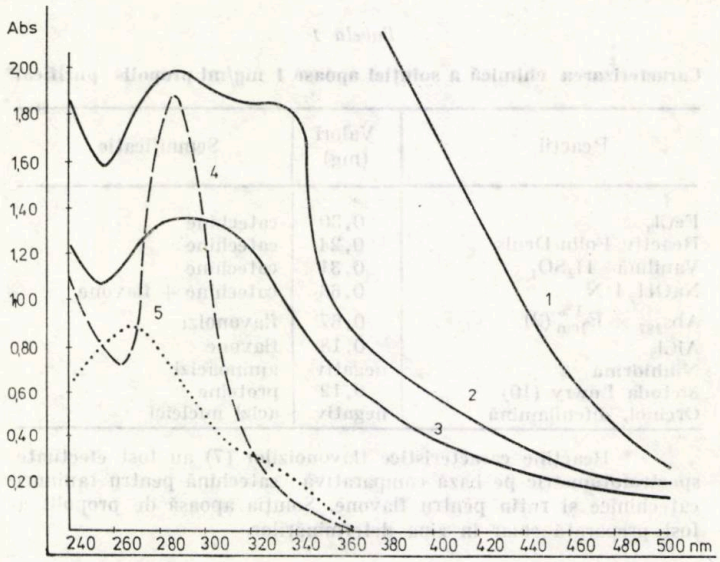


Fig. 1. — Spectrele de absorbţie în apă ale unor soluţii de propolis purificat: 1 mg/ml (*1*), 0,4 mg/ml (*2*), 0,16 mg/ml (*3*), comparativ cu cele ale unor soluţii de catechină 0,5 mg/ml (*4*) şi de rutin 0,4 mg/ml (*5*).

asemenea, şi observarea unui efect tensioactiv este în favoarea prezenţe. proteinelor, nefiind semnalată existenţa unor glucozide de tip saponine

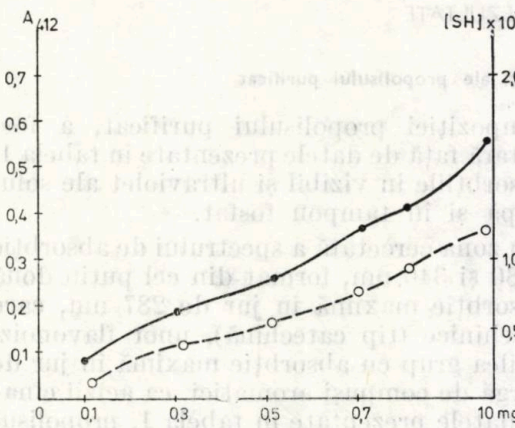


Fig. 2. — Reacţia propolisului dizolvat în tampon fosfat 0,010 M, pH 7,4, cu DTNB, reactiv specific grupărilor SH.
●——● Absorbţia la 412 nm a soluţiei de propolis.
o — — — o Conţinutul în grupări SH după corectarea interferenţei.

Reacţia propolisului cu serumalbumina

Ţinînd seama de conţinutul relativ mare al propolisului în taninuri catechinice (tabela 1), care au proprietatea de a precipita proteine (7), am studiat comparativ acţiunea acestor substanţe asupra albuminei

purificate. Acțiunea propolisului asupra albuminei este complexă, în concordanță cu compoziția lui, cu atît mai mult cu cît ambele substanțe absorb în aceeași regiune a spectrului (fig. 3, *B*).

După cum se observă din figura 3, *A*, propolisul, ca și catechina, produce o micșorare a absorbției la 280 nm în urma combinației cu albu-

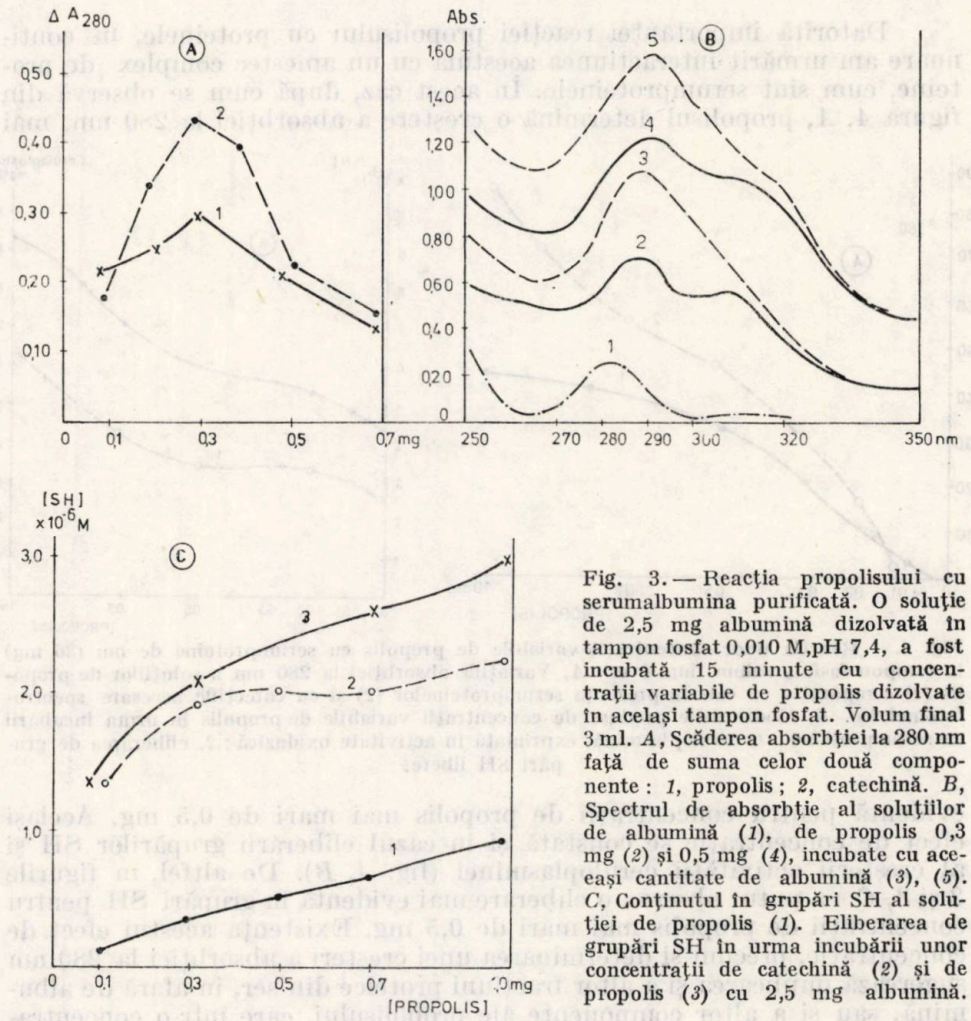


Fig. 3. — Reacția propolisului cu serumalbumina purificată. O soluție de 2,5 mg albumină dizolvată în tampon fosfat 0,010 M,pH 7,4, a fost incubată 15 minute cu concentrații variabile de propolis dizolvate în același tampon fosfat. Volum final 3 ml. *A*, Scăderea absorbției la 280 nm față de suma celor două componente : *1*, propolis ; *2*, catechină. *B*, Spectrul de absorbție al soluțiilor de albumină (*1*), de propolis 0,3 mg (*2*) și 0,5 mg (*4*), incubate cu aceeași cantitate de albumină (*3*), (*5*). *C*, Conținutul în grupări SH al soluției de propolis (*1*). Eliberarea de grupări SH în urma incubării unor concentrații de catechină (*2*) și de propolis (*3*) cu 2,5 mg albumină.

mina față de suma celor două absorbții. În timp ce catechina scade A_{280} în funcție de concentrație, propolisul produce același efect pentru toată gama de concentrație studiată, catechina fiind mai activă (fig. 3, *A*). Din comportarea asemănătoare, dar nu și identică, a propolisului cu catechina, precum și din aspectul curbelor în regiunea 300 nm, rezultă că în interacțiunea propolisului cu albumina intervin și alte componente, în afară de catechine, care sînt implicate în modificarea absorbției la 280 nm. Eliberarea unui conținut redus în grupări SH în reacția propo-

lisului cu albumina, evident faţă de concentraţia proprie, se datoreşte de asemenea componentei catechinice (fig. 3, *C*). În concluzie, acţiunea denaturantă a propolisului asupra albuminei este determinată de conţinutul apreciabil (tabela 1) în catechine.

Reacţia propolisului cu serumproteine

Datorită importanţei reacţiei propolisului cu proteinele, în continuare am urmărit interacţiunea acestuia cu un amestec complex de proteine, cum sînt serumproteinele. În acest caz, după cum se observă din figura 4, *A*, propolisul determină o creştere a absorbţiei la 280 nm, mai

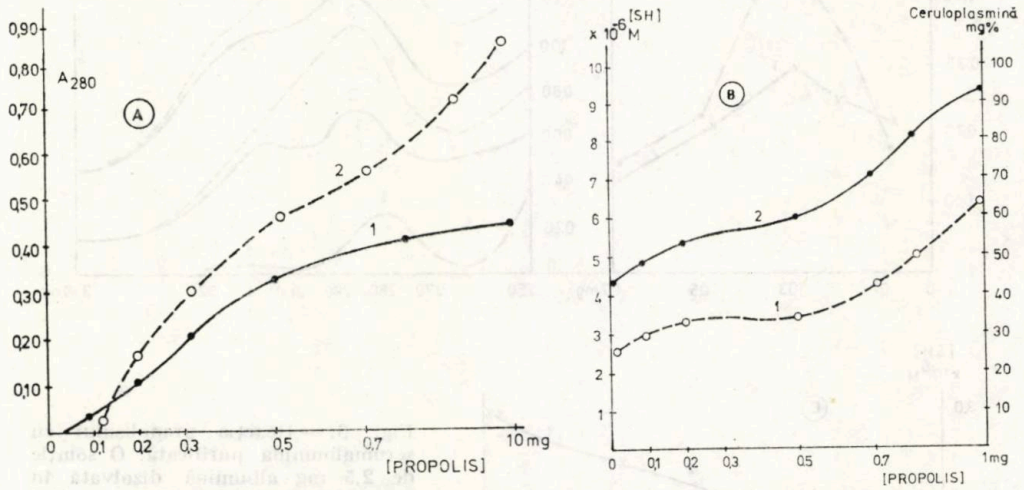


Fig. 4. — Reacţia unor concentraţii variabile de propolis cu serumproteine de om (36 mg) în tampon fosfat, volum final 6 ml. *A*, Variaţiile absorbţiei la 280 nm a soluţiilor de propolis (*1*) comparativ cu cele în prezenţa serumproteinelor (*2*) şi cu corecţiile necesare spectrofotometrice. *B*, Modificările produse de concentraţii variabile de propolis în urma incubării cu serumproteine : *1*, ceruloplasmină, exprimată în activitate oxidazică ; *2*, eliberarea de grupări SH libere.

evidentă pentru concentraţii de propolis mai mari de 0,5 mg. Acelaşi efect de concentraţie se constată şi în cazul eliberării grupărilor SH şi al creşterii activităţii ceruloplasminei (fig. 4, *B*). De altfel, în figurile 2 şi 3, *C* s-a putut observa o eliberare mai evidentă în grupări SH pentru concentraţii de propolis mai mari de 0,5 mg. Existenţa acestui efect de concentraţie, precum şi determinarea unei creşteri a absorbţiei la 280 nm sugerează implicarea şi a altor fracţiuni proteice din ser, în afară de albumină, sau şi a altor componente ale propolisului, care într-o concentraţie mai mare pot avea o acţiune denaturantă. Un astfel de efect de concentraţie este sprijinit şi de schimbarea pantei curbelor (fig. 3).

DISCUŢII

Lucrarea noastră a încercat în primul rînd o caracterizare biochimică, în sensul corelării unor componente preponderente ale propolisului de acţiunea acestuia asupra unei clase atît de importante ca proteinele.

Datele incluse în tabela 1 confirmă prezența în cantitate mare a flavonoizilor (1)—(3), dar prin rezultatele din figura 3 atribuie taninurilor catechinice o pondere apreciabilă în acțiunea propolisului asupra proteinelor. Cu toată interferența produsă de flavonoizi, prezența proteinelor în propolisul purificat pare verosimilă ținînd seama de datele din figurile 1 și 2. Existența unor complexe catechine-proteine (7) ar putea favoriza îmbogățirea cantității de proteine în cursul tratamentului de purificare. În acest fel s-ar explica și existența unui conținut redus în grupări SH libere, deși determinarea acestora în soluțiile apoase de propolis trebuie corectată pentru absorbția propolisului din regiunea vizibilă a spectrului (fig. 1 și 2).

Datorită componentei catechinice, propolisul are o acțiune denaturantă asupra albuminei și serumproteinelor, producînd modificări ale absorbției la 280 nm și eliberarea de grupări SH (fig. 3 și 4). Desigur, așa cum am arătat anterior (fig. 4), pentru concentrații mai mari de 0,5 mg, acțiunea denaturantă a propolisului devine mai clară probabil datorită implicării și a altor componente, mai ales a celor ce absorb în jur de 300 nm (fig. 1 și 3). În acest fel s-ar putea explica și capacitatea tensioactivă a propolisului, remarcată printr-un studiu comparativ asupra unor virusuri (11). Interacțiunea flavonoizi-proteine a fost recent studiată de Chișiu, Onică și colab. (12), care au arătat că un extract din sîmburi de struguri bogat în flavonoizi precipită selectiv imunoglobulina G, deși, în funcție de conținutul în aceste substanțe atît al extractului, cît și al proteinelor, și alte fracțiuni proteice pot fi precipitate.

Interacțiunea propolisului cu proteinele, precum și probabila capacitate tensioactivă explică parțial acțiunea bactericidă, utilizarea propolisului în chirurgie, oftalmologie etc. (1)—(3). Conținutul bogat în flavonoizi sugerează utilitatea propolisului în restabilirea permeabilității capilare (5), în influențarea ramificării colagenului (13), în inhibarea agregării trombocitelor (14). În toate aceste procese pare posibilă implicarea componentei catechinice prin intermediul interacțiunii cu proteine.

Creșterea activității ceruloplasminei poate fi un efect indirect al propolisului prin acțiunea sa denaturantă, dar poate fi și un rezultat direct în cazul cînd unele componente ale propolisului ar fi substraturi ale acestei enzime. Ceruloplasmina este singura oxidază caracteristică serului, cu substrat fiziologic încă necunoscut, așa încît foarte multe substanțe cu structură aromatică pot fi oxidate în urma acțiunii ceruloplasminei din ser chiar *in vitro* (15). Ca urmare, metabolizarea propolisului ar avea loc pe mai multe căi începînd din plasmă. În acest sens menționăm că propolisul nu este toxic în urma administrării orale, semnalîndu-se valori ale DL_{50} în jur de 1300 mg/kg (16). În viitor ne propunem studierea efectelor biochimice în urma administrării *in vivo*.

Autorii sînt recunoscători dr. Doina Onică de la Institutul „Dr. V. Babeș" și dr. Angela Harles de la ICCF pentru donarea de catechină și de rutin, ca și pentru discuțiile utile.

Prezentat la redacție
la 12 mai 1982

Spitalul clinic Fundeni, București
și
Centrul de apiterapie, București

BIOCHEMICAL MECHANISMS INVOLVED IN THE PHARMACODYNAMIC ACTION OF PROPOLIS. I. *IN VITRO* ACTION ON ALBUMIN AND SERUM PROTEINS

SUMMARY

By using absorption studies and chemical determinations it was found that the purified propolis contains great amounts of flavonoids and proteins. An attempt of standardization was also presented. The purified propolis might act as a denaturing agent by inducing structural modifications of the purified serum albumin as observed by the changes of the absorbance at 280 nm and the release of sulfhydryl groups as a consequence of the exposure of other polypeptide chains. The same modifications were observed following the incubation of human serum proteins with variable amounts of propolis. An increased activity of ceruloplasmin was also found. A discussion on the possible implications of propolis in therapeutics is presented based on our data.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Al doilea Simpozion internaţional de apiterapie*, Bucureşti, septembrie 1976.
2. * * * *Le troisième Symposium International d'Apithérapie*, Portroz, Yougoslavie, septembre 1978.
3. * * * *The Fourth International Symposium of Apitherapy*, Acapulco, Mexic, septembre 1981.
4. A. I. TIHONOV, V.I. GRITENKO, *Biologhiceskie aktivnîe substanţii propolisa*, în *Le troisième Symposion International d'Apithérapie*, Portroz, Yougoslavie, septembre 1978, p. 65.
5. A. DEREVICI, *Contribuţii la studiul propolisului*, în *Al doilea Simpozion internaţional de apiterapie*, Bucureşti, septembrie 1976, p. 196.
6. V. POPESCU, G. VELESCU, I. MAFTEI, *Determinarea activităţii transhidrogenazelor şi a substanţelor donoare de hidrogen în propolis*, în *Al doilea Simpozion internaţional de apiterapie*, Bucureşti, septembrie 1976, p. 174.
7. E. GRIGORESCU, I. STĂNESCU, *Farmacognozie*, I.M.F.-Iaşi, 1974, p. 226.
8. R. OLINESCU, I. MĂRGINEANU, Rev. roum. Biochim., **10**, 285(1973).
9. H.A. RAVIN, J. Lab. Clin. Med., **58**, 161(1961).
10. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
11. I. CRIŞAN, V. CIOCA, *Acţiunea propolisului asupra virusului herpetic*, în *Al doilea Simpozion internaţional de apiterapie*, Bucureşti, septembrie 1976, p. 104.
12. N.S. CHIŞIU, D. ONICĂ, O. MAIOR, S. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **24**, 35(1981).
13. C.N. RAO, R. SANJEEVI, Indian J. Biochem., **18**, 224(1981).
14. I.I. DEJANOV, L. JAMOSKI, A. STAROVA, *In vitro effects of propolis on platelet aggregation*, în *Le troisième Symposion International d'Apithérapie*, Portroz, Yougoslavie, septembre 1978, p. 90.
15. R. OLINESCU, N. PASCU, Rev. roum. Biochim., **19**, 49(1982).
16. A. ÉTIENNE, F. CLAUSTRE, Int. Rev. Entom. méd., 1370(1980).

CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL UNOR REZIDUURI DE MORCOVI ASUPRA CALITĂŢII PRODUSELOR AVICOLE

DOINA OŞIANU, V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, N. BICHIŞ

Rezumat. S-a cercetat efectul adaosului unor reziduuri de morcovi deshidrataţi la furajul administrat puilor de carne asupra calităţii acestora. În acest scop s-au urmărit absorbţia şi acumularea pigmenţilor carotenoidici şi a vitaminei A în diferite organe şi ţesuturi. S-au constatat o depozitare sporită de pigmenţi carotenoidici în ficat şi în carcasa puilor, precum şi o creştere a cantităţii de vitamina A în ţesutul hepatic.

Generalizarea industrializării creşterii păsărilor ridică o serie de probleme, dintre care furajarea lor ocupă un loc important. Conţinutul redus de fibroase (bogate în xantofile) din raţia furajeră, precum şi cantitatea mare de energie utilizată în procesele metabolice fac ca pigmentarea produselor avicole să scadă apreciabil. Acest fapt duce implicit la scăderea valorii lor comerciale.

Pigmentarea corespunzătoare a carcaselor puilor de carne şi a gălbenuşului ouălor constituie una din problemele actuale ale producţiei în combinatele avicole.

Dintre componenţii normali ai furajelor pentru păsări, numai porumbul şi făina de lucernă conţin pigmenţi carotenoidici oxigenaţi (xantofile), dar aceştia nu asigură întotdeauna nivelul de pigmenţi necesari, care variază foarte mult în funcţie de condiţiile de prelucrare şi de păstrare a produselor agricole (1). Suplimentarea furajelor cu pigmenţi carotenoidici naturali sau sintetici pentru a obţine o pigmentaţie corespunzătoare a produselor avicole ridică însă preţul de cost al acestora (2).

Pe linia valorificării unor resurse vegetale indigene în hrana păsărilor, colectivul nostru a recomandat, în scopul îmbunătăţirii pigmentaţiei carcaselor şi a ouălor, utilizarea polenului de porumb (3), a deşeurilor de gogoşari (4), a făinii de Tagetes (5) şi a deşeurilor de măceşe rezultate la fabricarea marmeladei (6).

În urma obţinerii unor concentrate carotenoidice din morcovi, necesare industriei de medicamente şi cosmetice, reziduurile rezultate mai conţin o cantitate apreciabilă de pigmenţi carotenoidici (35 mg/kg), din care aproximativ 85% este β-caroten. Compoziţia chimică brută a reziduurilor de morcovi este următoarea: apă 11,41% şi substanţă uscată 88,59%, din care proteină brută 9,80%, grăsime 0,14%, cenuşă 4,95%, celuloză 21,86%, extractive neazotate 63,25%. Această compoziţie ne-a sugerat utilizarea lor în hrana puilor.

În lucrarea de faţă ne-am propus să cercetăm efectul reziduurilor de morcovi deshidrataţi adăugaţi la un furaj administrat puilor de carne

asupra calității și aspectului comercial al acestora. În acest scop s-au urmărit unele aspecte biochimice privind absorbția carotenoidelor, acumularea lor în diferite organe și țesuturi, precum și asigurarea cu vitamină A a puilor de carne, dat fiind faptul că reziduurile de morcovi conțin β-caroten (provitamină A). Aspectele de alimentație fac obiectul altei lucrări.

MATERIAL ȘI METODE

Puii de carne Robro au fost împărțiți în trei loturi de experiență. Lotul 1 a primit un furaj standard, constituit pe bază de porumb, lotul 2 un furaj ce conținea 6% deșeuri de morcovi, care au înlocuit cantitatea corespunzătoare de porumb, iar lotul 3 a primit un furaj cu 12% deșeuri de morcovi. Cantitatea de pigmenți carotenoidici a acestor furaje este prezentată în tabela 1.

Tabela 1

Sursa și cantitatea de carotenoide din furaj

Lotul	Sursa de pigmenți	Carotenoide totale (mg/kg)
Lotul 1	porumb (65%)	13,1
Lotul 2	porumb (59%) deșeuri morcovi (6%)	15,8
Lotul 3	porumb (53%) deșeuri morcovi (12%)	17,8

La 57 de zile, puii au fost sacrificați și din fiecare lot s-au analizat cîte șase pui. După jumulire s-a stabilit pigmentația carcasei, apreciată în note Roche, acordate de trei observatori. S-au recoltat sînge, ficat, piele și grăsime subcutană și s-au efectuat analize de carotenoide totale și vitamină A.

Analiza carotenoidelor din sînge și ficat. Sîngele și ficatul proaspăt recoltat au fost cîntărite și apoi deshidratate cu Na_2SO_4 anhidru într-un mojar și adus sub formă de pulbere. După transferarea într-un tub de eluție, s-au extras pigmenții carotenoidici pînă la epuizare cu un amestec de eter de petrol/eter etilic/etanol (50/50/2). Soluția rezultată a fost măsurată ca atare sau după o prealabilă concentrare, iar cantitatea totală de pigmenți a fost determinată cu un spectrofotometru Specord UV-VIS.

Analiza carotenoidelor din piele și din grăsimea subcutană. Analiza carotenoidelor din piele și din grăsimea subcutană s-a efectuat după metoda recomandată de Quackenbush și colab. (7) pentru aceste țesuturi.

Determinarea vitaminei A din sînge și ficat s-a realizat după metoda Budowsky-Bondi (8).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cantitatea de carotenoide existentă în sîngele puilor (tabela 2) variază în limite destul de largi (50—140 g/100 g), neobservîndu-se diferențe semnificative între cele trei loturi. În ceea ce privește cantitatea de vitamină A, aceasta este net superioară la loturile 2 și 3, care au primit în hrană pigmenți carotenoidici proveniți din morcovi.

Depozitarea carotenoidelor și a vitaminei A în țesutul hepatic este prezentată în tabela 3. Se constată că în ficatul puilor din loturile 2 și 3 se acumulează o cantitate sporită de carotenoide și de vitamină A față de lotul martor. Această constatare este deosebit de importantă dat fiind

Tabela 2

Variaţia carotenoidelor (µg/100 g) şi a vitaminei A (U.I.) din sîngele puilor

Specificare	Lotul 1		Lotul 2		Lotul 3	
	carotenoide	vitamina A	carotenoide	vitamina A	carotenoide	vitamina A
1	90	300	80	464	70	491
2	70	280	50	344	70	492
3	120	442	60	628	50	628
4	80	344	70	518	90	492
5	80	380	90	453	90	630
6	90	362	70	464	140	537
Media	88	351	70	480	86	545

Tabela 3

Variaţia carotenoidelor (µg/100 g) şi a vitaminei A (U.I.) din ficatul puilor

Specificare	Lotul 1		Lotul 2		Lotul 3	
	carotenoide	vitamina A	carotenoide	vitamina A	carotenoide	vitamina A
1	299	5820	490	7600	443	7880
2	264	5410	410	7820	551	8200
3	190	5200	490	6810	330	8350
4	200	5020	398	6720	339	7540
5	316	4920	231	6890	257	7720
6	234	4870	299	6980	234	7970
Media	250	5206	386	7136	360	7943

Tabela 4

Variaţia carotenoidelor (µg/100 cm²) din pielea puilor

Specificare	Lotul 1		Lotul 2		Lotul 3	
	note Roche	carotenoide	note Roche	carotenoide	note Roche	carotenoide
1	1,5	216	2,25	874	1,5	320
2	1	224	2,5	480	2,25	588
3	2	260	3	720	2,75	720
4	1,25	209	2,5	535	2	528
5	1,75	336	2	540	3	552
6	1,25	232	3	756	3	596
Media	1,45	246	2,54	651	2,41	550

rolul vitaminei A şi al carotenoidelor atît ca precursori ai acesteia pentru organismul animal, cît şi ca antioxidanţi.

Urmărind pigmentaţia carcaselor, se observă în general o îmbunătăţire a acesteia la loturile de experienţă faţă de lotul martor (tabela 4).

Tabela 5

Variația carotenoidelor (µg/100 g) din grăsimea subcutană

Nr.	Lotul 1	Lotul 2	Lotul 3
1	108	140	172
2	124	124	168
3	104	156	180
4	100	174	166
5	98	160	198
6	114	182	175
Media	108	156	176

Această îmbunătățire a pigmentației se datorește acumulării unei cantități sporite de pigmenți carotenoidici, care crește de 2—2,5 ori la loturile 2 și 3 față de lotul 1.

Analizînd cantitatea de carotenoide depozitată în grăsimea subcutană (tabela 5), se constată că și aceasta înregistrează o creștere în cazul loturilor 2 și 3, asigurate cu o hrană ce conține cantități sporite de pigmenți carotenoidici.

Se constată existența unei corelații pozitive între cantitatea de carotenoide din furajul administrat și pigmentația țesuturilor periferice.

CONCLUZII

În urma coroborării rezultatelor, se desprind următoarele concluzii:

1. Prin introducerea în rețeta furajului destinat puilor de carne a 6—12 g% reziduuri de morcovi, se produce o creștere a cantității de pigmenți carotenoidici cu 3 și, respectiv, 5 mg/kg furaj.

2. Cantitatea de carotenoide vehiculate în sînge nu este dependentă strict de cea existentă în furajul administrat puilor, pe cînd cea de vitamină A crește considerabil la loturile ce au primit în hrană provitamină A, obținută din reziduurile de morcovi.

3. În ficat se depozitează o cantitate sporită atît de carotenoide, cît și de vitamină A la loturile de experiență, ceea ce duce la o bună aprovizionare a organismului cu această vitamină, deosebit de importantă din punct de vedere fiziologic.

4. Pigmentația carcaselor este net îmbunătățită la loturile de experiență, ceea ce denotă o valorificare superioară a pigmenților carotenoidici din hrană, care duce la o calitate superioară a puilor și implicit la creșterea valorii comerciale.

Datorită acestor rezultate se recomandă utilizarea reziduurilor de morcovi în hrana puilor de carne.

Prezentat la redacție
la 19 decembrie 1981

*Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" Cluj-Napoca,
Disciplinele de biochimie și alimentație*

RESEARCHES ON THE EFFECT OF CARROT RESIDUES ON THE QUALITY OF POULTRY PRODUCTS

SUMMARY

The addition of dehydrated carrot residues in the feed of broilers has revealed the absorption and accumulation of carotenoid pigments and of vitamin A in various organs and tissues. A supplementary storage of carotenoid pigments was found in the liver and the carcass of broilers and an increase of vitamin A in their hepatic tissue.

BIBLIOGRAFIE

1. I. WILDFEUER, L. ACKER, Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, **133**, 341 (1967).
2. P.W. WALDROUP, T.L. GOODWIN, Z.B. JOHNSON, K.B. LOWE, Nutrition Reports International, **20**, 567(1979).
3. V. TĂMAȘ, GH. SĂLĂJAN, C. BODEA, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).
4. GH. SĂLĂJAN, V. TĂMAȘ, St. cerc. biochim., **19**, 183(1976).
5. A. HORHAT, S. CSEH, E. NICOARĂ, D. OȘIANU, *Contribuții studențești la cercetarea științifică*, Centrul universitar Cluj-Napoca, 1977, p. 93.
6. E. NICOARĂ, D. OȘIANU, B. DEMKO, St. cerc. biochim., **17**, 265(1974).
7. F.W. QUACKENBUSH, S. KVAKOVSZKY, T. HOVER, J.C. ROAGLER, J. AOAC, **48**, 124(1965).
8. R. STROHECKER, H.M. HENNING, *Vitamin Assay. Tested Methods*, Verlag Chemie, GMBH Weinheim, 1965, p. 42.

STUDIUL PROPRIETĂŢILOR CATALITICE ALE KALICREINEI IMOBILIZATE PE AGAROZĂ RETICULATĂ ŞI ACTIVATĂ CU BrCN

HORST D. SCHELL, MELANIA ARSENE

Rezumat. Prin legarea covalentă a kalicreinei din ser de şobolan de un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN, se obţine un preparat enzimatic insolubil, catalitic activ, cu un conţinut proteic de 2,5 mg/ml gel. Kalicreina imobilizată prezintă o activitate proteolitică reziduală de 15% (substrat cazeină) şi o activitate esterazică reziduală de 95% (substrat BAEE). Prin imobilizare, enzima îşi deplasează pH-ul optim de acţiune proteolitică cu o unitate spre domeniul alcalin şi devine mai termostabilă şi mai rezistentă la acţiunea inhibitorului ei natural, aprotinina (Trasylol). În urma imobilizării, kalicreina îşi micşorează constanta Michaelis de 4,5 ori faţă de substratul BAEE.

Kalicreina (EC 3.4.21.8), endopeptidază din grupul kininogenazelor, se găseşte în pancreas, în sînge şi în alte ţesuturi. Are efect hipotensiv, exercitat prin acţiunea ei catalitică asupra kalidinogenului, o α-2-globulină din plasmă (1), eliberînd rapid prin proteoliză limitată kalidina, polipeptid fiziologic activ, care scade tensiunea arterială sistolică şi diastolică(2). Datorită acestei proprietăţi, kalicreina îşi găseşte aplicaţii practice în terapia unei serii de tulburări circulatorii. Această enzimă prezintă totodată interes deosebit şi prin faptul că prin imobilizarea ei se obţin suporturi afine care pot fi utile pentru separarea prin cromatografie de afinitate a aprotininei (Trasylol), un inhibitor polivalent de proteaze apreciat în clinică la tratamentul şi profilaxia diferitelor stări de şoc şi în profilaxia complicaţiilor postoperatorii şi posttraumatice, datorită acţiunii sale inhibitoare selective asupra mai multor proteaze implicate în procesele de coagulare şi fibrinoliză.

Ţinînd seama de importanţa biologică a kalicreinei şi de perspectivele ei de aplicare în stare imobilizată la separarea de inhibitori naturali ai proteazelor, prezentăm în continuarea unei lucrări anterioare (3), referitoare la separarea acestei enzime prin cromatografie de afinitate pe Trasylol imobilizat, obţinerea şi proprietăţile kalicreinei imobilizate prin legarea ei covalentă de un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN, în comparaţie cu proprietăţile enzimei libere nelegate.

MATERIAL ŞI METODE

Imobilizarea kalicreinei prin legare covalentă de agaroză reticulată şi activată cu BrCN. Peste 15 ml gel de agaroză perlată, legată încrucişat (4) şi activată cu BrCN (Merck) după Axén şi colab. (5), se adaugă 50 mg kalicreină dizolvată în 10 ml $NaHCO_3$ 0,1 M şi se lasă amestecul de reacţie la temperatura camerei pînă a doua zi. Produsul de reacţie obţinut este apoi spălat alternativ cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea

completă a enzimei nelegate. Gelul enzimatic rezultat este suspendat în apă distilată și păstrat la rece pînă la folosire.

Cantitatea de kalicreină cuplată de suportul insolubil s-a determinat dozînd prin kjeldahlizare, înainte și după cuplare, azotul conținut într-un volum exact măsurat de gel perlat de agaroză (0,2 ml). Diferența dintre cele două valori, înmulțită cu factorul 6,25, reprezintă conținutul proteic, exprimat în mg proteină/ml gel enzimatic.

Activitatea proteolitică a kalicreinei libere și imobilizate a fost determinată după metoda descrisă de Kunitz (6), folosindu-se ca substrat cazeină, și a fost exprimată în μ moli tirozină/min/mg proteină la 37°C. În amestecul de reacție s-a folosit 0,1 mg kalicreină liberă sau 0,125 mg kalicreină imobilizată (0,1 ml gel enzimatic).

Activitatea esterazică a kalicreinei libere și imobilizate a fost determinată după metoda dată de Schwert și Takenaka (7), folosindu-se ca substrat N-benzoil-L-arginin-etilesterul (BAEE), și a fost exprimată, după indicația autorilor citați, în unități/mg proteină/min la 25°C. În amestecul de reacție s-au folosit 0,2 ml soluție de enzimă liberă (0,02 mg kalicreină), respectiv 0,2 ml gel enzimatic (0,5 mg enzimă imobilizată).

Variația activității proteolitice a kalicreinei libere și imobilizate în funcție de pH s-a urmărit în tampon borat 0,1 M, la următoarele valori de pH : 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 și 10,0.

Efectul temperaturii de preincubare asupra activității proteolitice a kalicreinei libere și imobilizate a fost urmărit prin menținerea probelor ce conțineau enzima liberă, respectiv cea imobilizată, timp de 30 min, înainte de a le introduce în amestecul de reacție, la următoarele temperaturi : 0, 15, 25, 37, 45, 55, 65 și 75°C. Reacția enzimatică a fost condusă apoi la temperatura de 37°C. Studierea comportării celor două preparate enzimatice la temperaturi mai ridicate, și anume la 45, 55 și 65°C, s-a realizat și prin incubarea lor timp de 15, 30, 45 și 60 min.

Efectul temperaturii de reacție asupra activității proteolitice a kalicreinei libere și imobilizate a fost studiat urmărindu-se desfășurarea reacției asupra cazeinei la temperaturi de 0, 15, 25, 37, 45, 55, 65 și 75°C.

Efectul concentrațiilor de substrat a fost urmărit atît în cazul activității proteolitice, cît și al celei esterazice a celor două preparate de enzimă. În primul caz s-a lucrat cu diferite concentrații de cazeină cuprinse între 0,4 și 4,8 mg/probă, iar în cel de-al doilea caz cu diferite concentrații de BAEE cuprinse între 0,043 și 0,258 mg/probă, ceea ce corespunde la o concentrație de $4 \cdot 10^{-5}$—$25 \cdot 10^{-5}$ M. Prin reprezentarea grafică a reciprocelor vitezelor de reacție în funcție de reciprocele concentrațiilor de substrat după metoda Lineweaver-Burk (8) s-au determinat și constantele Michaelis pentru enzima liberă și legată în cazul substratului, BAEE.

Variația activității esterazice a kalicreinei libere și imobilizate în funcție de concentrația inhibitorului său natural, Trasylolul, s-a urmărit folosindu-se în mediul de reacție cantități crescînde de inhibitor, cuprinse între 0,25 și 2,00 mg/probă, și o concentrație de substrat (BAEE) de $8 \cdot 10^{-5}$ M. Pentru determinarea constantei de inhibiție (K_i) după metoda Dixon (9), s-a urmărit efectul aceleași concentrații de inhibitori și la o a doua concentrație de substrat ($4 \cdot 10^{-5}$ M).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin legarea covalentă a kalicreinei de un gel perlat de agaroză reticulată cu epiclorhidrină și activată cu BrCN, se obține un preparat enzimatic activ, insolubil, cu un conținut proteic de 2,5 mg/ml gel depus și o activitate proteolitică reziduală de 15%, cea esterazică reziduală fiind de 95%. Această diferență mare observată între cele două tipuri de activități enzimatice reziduale este o comportare cunoscută și tipică pentru acele enzime imobilizate care acționează atît asupra unor substrate cu masă moleculară ridicată, cît și asupra celor cu masă moleculară joasă și se datorează unor împiedicări sterice pe care le întîmpină substratul cu masă moleculară ridicată în accesul său la situsul activ al enzimei fixate de suportul insolubil. O comportare similară am observat și în cazul α-chimotripsinei, care în urma imobilizării prezenta, față de cazeină, o activitate proteolitică reziduală doar de 8%, în timp ce activitatea este-

razică reziduală, testată pe esteri cu masă moleculară mică, era de asemenea surprinzător de ridicată, atingînd valori de 80—96% (10).

Din figura 1 se constată că enzima liberă prezintă un maxim de activitate la pH 8,0, iar prin imobilizare îşi deplasează valoarea de pH

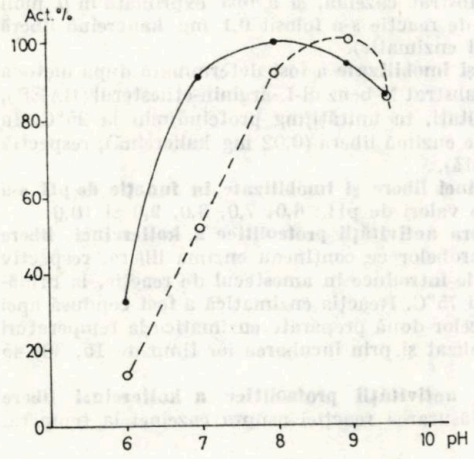


Fig. 1. — Variaţia activităţii proteolitice a kalicreinei libere (● ——— ●) şi imobilizate (o — — — o) în funcţie de pH-ul mediului de reacţie.

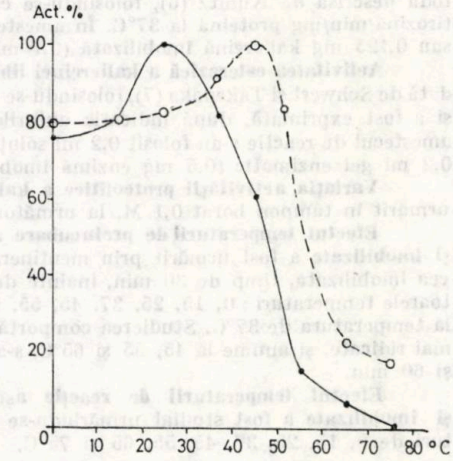


Fig. 2. — Variaţia activităţii proteolitice a kalicreinei libere (● ——— ●) şi imobilizate (o — — — o) în funcţie de temperatura de preincubare (30 min).

optim cu o unitate spre domeniul alcalin. Ambele preparate enzimatice îşi reduc activitatea catalitică la valori de pH mai acide şi mai alcaline.

În figura 2 se prezintă influenţa temperaturii de preincubare asupra activităţii proteolitice a kalicreinei libere şi imobilizate. Se poate constata că prin imobilizare enzima devine mai termostabilă. Astfel, în timp ce la temperatura de 45°C enzima legată prezintă activitatea ei cea mai ridicată, cea liberă îşi pierde în aceste condiţii 40% din activitatea maximă. Prin păstrare timp de 30 min la 55°C, enzima liberă îşi pierde 85% din activitate, pe cînd cea imobilizată doar 18%. La o preincubare de 30 min la 75°C, situaţie în care enzima liberă şi-a pierdut complet activitatea proteolitică, enzima imobilizată mai prezintă încă o activitate de 18% din cea maximă.

În scopul de a surprinde efectul temperaturilor mai crescute asupra kalicreinei libere şi imobilizate şi în funcţie de durata de expunere, s-a urmărit (fig. 3) variaţia activităţii lor proteolitice la temperaturile de 45°C (*a*), 55°C (*b*), 65°C (*c*) şi la intervale de 15 min, timp de o oră. Aşa cum rezultă din figura 3, la temperatura de 45°C, enzima imobilizată îşi păstrează practic integral activitatea iniţială chiar după 60 min de incubare, în timp ce enzima liberă pierde în aceste condiţii 85% din activitatea ei. La o temperatură de 55°C, cînd enzima imobilizată îşi păstrează după 60 min încă 73% din activitate, cea liberă prezintă în aceste condiţii doar 12% din activitatea ei iniţială. În sfîrşit, la temperatura de 65°C se constată că enzima liberă îşi pierde complet activitatea proteolitică

după 45 min de preincubare, în timp ce enzima imobilizată își mai păstrează în aceste condiții încă 20% din activitatea inițială.

Urmărind variația activității enzimatice a kalicreinei libere și imobilizate în funcție de temperatura de reacție (fig. 4), se constată o compor-

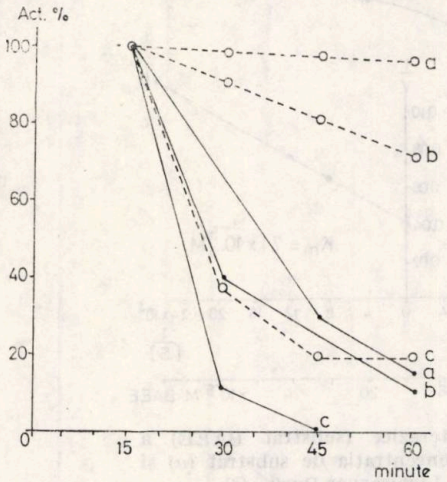


Fig. 3. — Variația activității proteolitice a kalicreinei libere (●——— ●) și imobilizate (o — — — o) în funcție de timpul de preincubare la temperaturi de 45°C (*a*), 55°C (*b*) și 65°C (*c*).

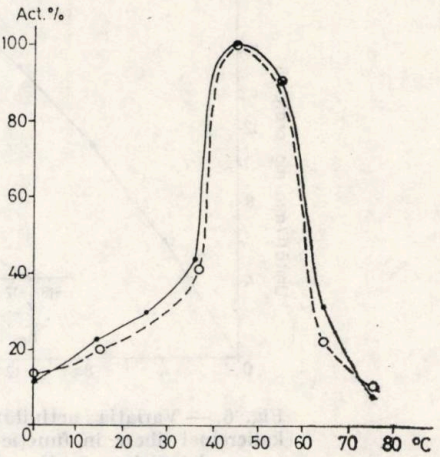


Fig. 4. — Influența temperaturii de reacție asupra activității proteolitice a kalicreinei libere (●——— ●) și imobilizate (o — — — o).

tare practic similară a celor două preparate enzimatice. Atît enzima liberă, cît și cea imobilizată prezintă o activitate optimă la 45°C. Crescînd temperatura de reacție la 55°C, are loc în ambele cazuri o reducere doar

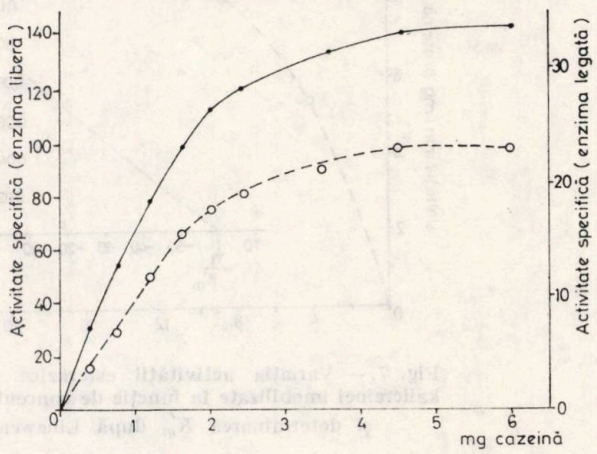


Fig. 5. — Variația activității proteolitice a kalicreinei libere (●— — — ●) și imobilizate (o— — — o) în funcție de concentrația de substrat (cazeină).

de 10%, pentru ca la 65°C să se observe o scădere considerabilă a activității proteolitice la ambele preparate enzimatice.

În figura 5 sînt prezentate activitățile proteolitice ale kalicreinei libere și imobilizate în funcție de concentrația de cazeină. Variația activi-

tăţilor proteolitice specifice ale enzimei libere şi imobilizate la diferite concentraţii de cazeină este asemănătoare şi reprezentată printr-o curbă clasică Michaelis-Menten.

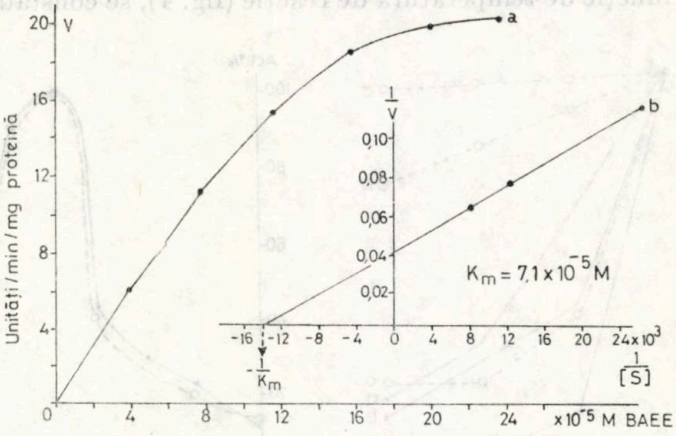


Fig. 6. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BAEE) a kalicreinei libere în funcţie de concentraţia de substrat (*a*) şi determinarea K_m după Lineweaver-Burk (*b*).

Urmărind activitatea esterazică în funcţie de diferite concentraţii ale substratului BAEE la kalicreina liberă (fig. 6 — *a*) şi la cea imobilizată (fig. 7 — *a*) şi reprezentînd reciprocele vitezelor de reacţie în funcţie

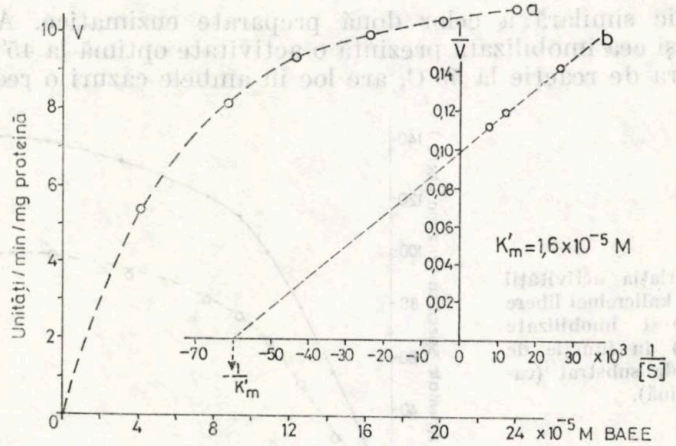


Fig. 7. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BAEE) a kalicreinei imobilizate în funcţie de concentraţia de substrat (*a*) şi determinarea K'_m după Lineweaver-Burk (*b*).

de reciprocele concentraţiilor de substrat (fig. 6 — *b* şi 7 — *b*) în vederea determinării constantelor Michaelis, se constată că în urma imobilizării kalicreina îşi micşorează valoarea K_m de circa 4,5 ori ($K'_m = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$ M) în comparaţie cu enzima liberă ($K_m = 7{,}1 \cdot 10^{-5}$ M). Valoarea K_m a

kalicreinei izolate de noi din ser de șobolan are același ordin de mărime cu valoarea K_m găsită de Yano și colab. (11) la kalicreina din ser bovin ($9{,}62 \cdot 10^{-5}$ M).

Din figura 8 rezultă acțiunea diferitelor concentrații de aprotinină asupra activității esterazice a kalicreinei libere și imobilizate. Se poate

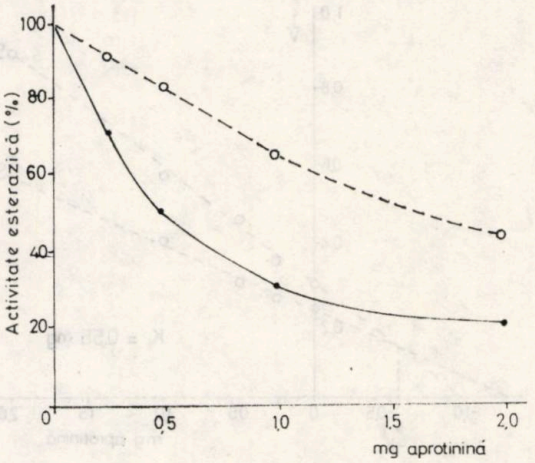


Fig. 8. — Efectul inhibitorului proteazic natural aprotinina asupra activității esterazice (substrat BAEE) ($8 \cdot 10^{-5}$M) a kalicreinei libere (● ——— ●) și imobilizate (o — — — o).

constata ușor că, în urma legării covalente de suportul insolubil, kalicreina devine considerabil mai rezistentă față de acest inhibitor. Astfel, în timp ce la o concentrație de 0,5 mg inhibitor în mediul de reacție enzima liberă își reduce activitatea esterazică cu 50%, enzima imobilizată își mai păstrează în aceste condiții încă 80% din activitatea inițială. La o concentrație de 2,0 mg aprotinină în mediul de reacție, enzima liberă pierde

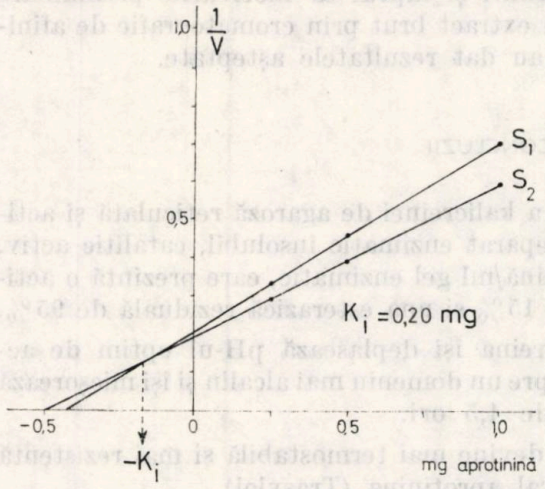


Fig. 9. — Determinarea constantei de inhibiție (K_i) a aprotininei pentru activitatea esterazică (substrat BAEE) a kalicreinei libere după metoda Dixon. Concentrațiile de substrat folosite în reacție au fost $4 \cdot 10^{-5}$ M (S_1) și $8 \cdot 10^{-5}$ M (S_2).

80% din activitatea inițială, în timp ce enzima imobilizată își mai păstrează încă peste 40% din activitate. Acest fapt se oglindește de altfel și în constantele de inhibiție respective, care pentru enzima liberă prezintă o valoare de 0,20 mg (fig. 9), iar pentru enzima imobilizată valoarea

de 0,55 mg (fig. 10). Din figurile 9 şi 10 se constată totodată că inhibiţia exercitată de aprotinină asupra activităţii esterazice a kalicreinei este de tip competitiv atît în cazul enzimei libere, cît şi în cel al enzimei imobilizate. Prin această comportare, kalicreina imobilizată se integrează în

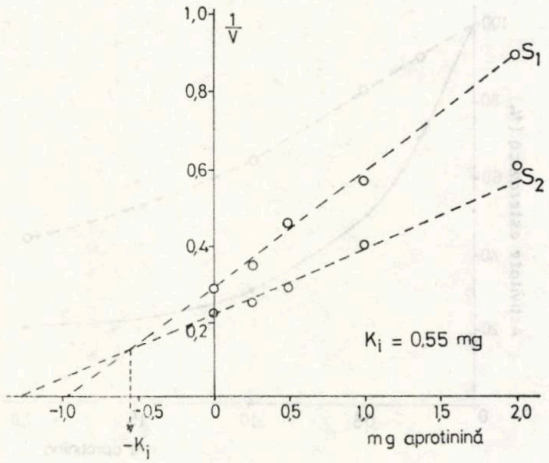


Fig. 10. — Determinarea constantei de inhibiţie (K_i') a aprotininei pentru activitatea esterazică (substrat BAEE) a kalicreinei imobilizate după metoda Dixon. Valorile celor două concentraţii de substrat S_1 şi S_2 sînt identice cu cele din figura 9.

comportamentul general al enzimelor imobilizate faţă de inhibitorii lor, enzime care, datorită unei stabilizări a macromoleculelor proteice în urma imobilizării prin fixare covalentă de suporturi insolubile, devin mai rezistente şi faţă de acţiunea inhibitorilor lor naturali sau de sinteză (11)—(16).

Ca încheiere, se poate aminti şi faptul că încercările preliminare de a separa aprotinina dintr-un extract brut prin cromatografie de afinitate pe kalicreină imobilizată au dat rezultatele aşteptate.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a kalicreinei de agaroză reticulată şi activată cu BrCN se obţine un preparat enzimatic insolubil, catalitic activ, cu un conţinut de 2,5 mg proteină/ml gel enzimatic, care prezintă o activitate proteolitică reziduală de 15% şi una esterazică reziduală de 95%.

2. Prin imobilizare, kalicreina îşi deplasează pH-ul optim de acţiune proteolitică cu o unitate spre un domeniu mai alcalin şi îşi micşorează valoarea K_m faţă de BAEE de 4,5 ori.

3. Kalicreina imobilizată devine mai termostabilă şi mai rezistentă la acţiunea inhibitorului natural aprotinina (Trasylol).

Prezentat la redacţie
la 21 ianuarie 1982

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de biologie moleculară,
77748 Bucureşti 17, Splaiul Independenţei nr. 296

UNTERSUCHUNG DER KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN DES AN BrCN-AKTIVIERTE AGAROSE GEBUNDENEN KALLIKREINS

ZUSAMMENFASSUNG

Durch kovalente Bindung von Kallikrein (EC 3.4.21.8) aus Rattenserum an perlförmiges Gel vernetzter und BrCN-aktivierter Agarose wurde ein katalytisch aktives unlösliches Enzympräparat mit einem Proteingehalt von 2,5 mg/ml Gel erhalten. Das trägerfixierte Kallikrein wies eine proteolytische Restaktivität von 15 % auf (Substrat Cazein) während die entsprechende Esteraseaktivität 95 % betrug (Substrat BAEE), Durch Bindung an den unlöslichen Träger verschiebt das Enzym sein pH-Optimum um eine Einheit dem alkalischen Gebiete zu, wird thermostabiler und reagiert weniger empfindlich auf die Einwirkung seines natürlichen Inhibitors Aprotein (Trasylol). Die Michaelis-Konstante verringert sich beim trägergebundenen Kallikrein um das 4,5-fache gegenüber BAEE.

BIBLIOGRAFIE

1. E. WERLE, in *The Chemistry and Pharmacology of Kallikrein and Kallidin*, Livingstone, Edinburgh (Scotland), 1955.
2. E. WERLE, U. BEREK, Angew. Chem., **60 A**, 53 (1948).
3. H.D. SCHELL, M. ARSENE, Rev. roum. Biochim., **19**, 63 (1982).
4. H.D. SCHELL, T. BENȚIA, M.A. MATEESCU, Brevet R.S. România nr. 65382/1977.
5. R. AXÉN, J. PORATH, S. ERNBACK, Nature, **214**, 1302 (1967).
6. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **30**, 291 (1947).
7. C. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. Biophys. Acta, **16**, 570 (1955).
8. H. LINEWEAVER, D. BURK, J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
9. M. DIXON, Biochem. J., **55**, 170 (1953).
10. H.D. SCHELL, A. WAHEED, D. BĂNĂȚEANU, M. RABEGA, T. BENȚIA, St. cerc. biochim., **24**, 97 (1981).
11. M. YANO, S. NAGASAWA, T. SUZUKI, J. Biochem., **67**, 713 (1970).
12. H. D. SCHELL, M.A. MATEESCU, K. H. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **17**, 77 (1980).
13. H.D. SCHELL, I. CORNOIU, M. GÎRTAN, St. cerc. biochim., **23**, 75 (1980).
14. H. D. SCHELL, I. CORNOIU, St. cerc. biochim., **23**, 183 (1980).
15. D. BĂNĂȚEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 21 (1981).
16. D. BĂNĂȚEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 135 (1981).

FOTOOXIDAREA IREVERSIBILĂ A CLOROFILELOR *IN VITRO*

ALEXANDRINA ŞTIRBEŢ, GR. TURCU

Rezumat. S-a studiat fotostabilitatea soluţiilor de clorofilă a şi b, fiind evidenţiate următoarele rezultate : 1) viteza fotooxidării ireversibile (fotodecolorării) a fost mai mare la clorofila a decît la clorofila b ; 2) substanţele folosite ca agenţi protectori împotriva fotodecolorării clorofilelor au avut o capacitate de protecţie ce a depins de concentraţia şi de natura lor chimică.

In vivo, clorofilele funcţionează pe baza fotooxidării şi a fotoreducerii lor reversibile (1), fiind protejate de către pigmenţii carotenoizi şi de fosfolipidele din membrana tilacoidală (2). Extrase din mediul lor natural şi expuse la lumină, suferă o fotooxidare ireversibilă, numită fotodecolorare. Mecanismul prin care are loc acest proces nu este pe deplin elucidat. Krasnovski şi colab. (3), (4) consideră că în acest fotoproces are loc transferul energiei de la o moleculă de clorofilă în stare tripletică, Chl′, la o moleculă de oxigen, rezultînd un complex de clorofilă cu oxigen în stare singletică, Chl ... $^1O_2$. Reacţia oxigenului singletic cu pigmentul dă naştere unor fotoperoxizi labili ai clorofilei, $ChlO_2$, din care, în final, prin descompunere termică, rezultă produşii stabili de fotooxidare ai clorofilei, Y.

Cercetările întreprinse în laboratorul nostru, care vizează utilizarea *in vitro* a pigmenţilor clorofilieni în dispozitive de conversie a energiei solare, au ridicat problema stabilizării acestora. Lucrarea de faţă îşi propune investigarea efectului fotoprotector al unor substanţe asupra soluţiilor de clorofilă în diverse condiţii experimentale.

MATERIALE ŞI METODE

Clorofilele a şi b au fost extrase din frunze de spanac *(Spinacia oleracea)* după metoda Strain şi Svec (5), iar concentraţia lor a fost determinată spectrofotometric folosindu-se relaţiile lui Livingston (6).

Substanţele utilizate ca fotoprotectori au fost β-carotenul, trinitrofenolul şi β-nitrozo-α-naftolul (Merck), p-nitrofenolul (Chemapol), 2,4-dinitrofenolul (Soiuzreactivit) şi nitrobenzenul (Reactivul Bucureşti). Ca solvenţi au fost utilizaţi alcoolul metilic, benzenul şi eterul etilic (Reactivul Bucureşti).

Toate probele au fost obţinute prin amestecarea a 1,5 ml soluţie stoc de clorofilă cu 0,5 ml solvent sau soluţie de substanţă protectoare. Concentraţia finală a clorofilei s-a menţinut constantă, 5×10^{-6}M, şi s-a variat concentraţia protectorului.

Iluminarea probelor s-a efectuat printr-un filtru roşu cu o lampă de 500 W cu filament de wolfram. În timpul iluminării, probele au fost termostatate.

Scăderea maximului de absorbţie din roşu al clorofilelor a fost urmărită cu un spectrofotometru SPECORD UV-Vis, iar rezultatele au fost exprimate în procente de clorofilă fotodecolorată per minut.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figura 1 este reprezentată grafic dependenţa vitezei de oxidare ireversibilă a clorofilei a în funcţie de timpul de iluminare. Se observă că, pe măsură ce timpul de iluminare creşte, viteza de oxidare scade. Această scădere era de aşteptat, avîndu-se în vedere că atit viteza de

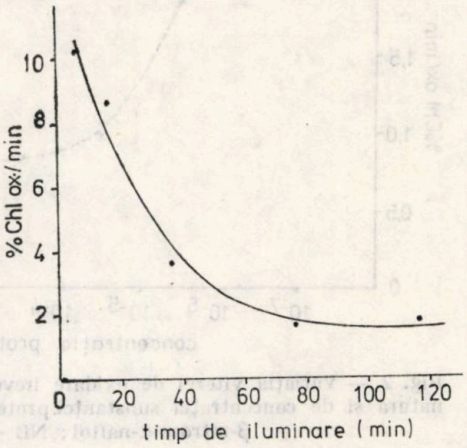


Fig. 1. — Dependenţa vitezei de oxidare ireversibilă a clorofilei în funcţie de timpul de iluminare.

formare a clorofilei tripletice, cît şi viteza de reacţie dintre oxigenul singletic şi clorofilă sînt direct proporţionale cu concentraţia de clorofilă.

S-a evidenţiat faptul că viteza de fotooxidare ireversibilă a clorofilei b este mai mică decît a clorofilei a. Fotorezistenţa crescută a clorofilei b faţă de clorofila a poate fi corelată cu datele din studiul fotoconducţiei soluţiilor de clorofilă, care indică un fotocurent mai mare pentru clorofila a decît pentru clorofila b (L. Ţugulea, date nepublicate, 1982). De altfel, se pare că şi *in vivo* clorofilei a îi revine rolul de centru de reacţie ce suferă oxidoreducerea reversibilă, în timp ce clorofila b joacă doar rolul de pigment accesoriu (7).

Viteza de fotooxidare ireversibilă a clorofilei este mai mare în benzen (2,5 % Chl ox./min) decît în alcoolul metilic (1,4 % Chl ox./min). Acest rezultat este datorat nesaturării coordinative a magneziului central din molecula de clorofilă (8). Cînd clorofila este dizolvată într-un solvent organic polar nucleofilic cu proprietăţi de donor de electroni, o moleculă de solvent poate ocupa una sau ambele poziţii axiale ale magneziului. Cînd clorofila este dizolvată în benzen, tetraclorură de carbon, o hidrocarbură alifatică sau nealifatică, care nu are proprietăţi donoare şi în care nu există donori străini, singura cale de a satisface coordinaţia nesaturată a magneziului este ca molecula de clorofilă să fie donor pentru o altă moleculă de clorofilă. Avînd în vedere concentraţia mică de clorofilă din probe (5×10^{-6} M), este puţin probabil ca în benzen moleculele de clorofilă să fi acţionat între ele formînd dimeri, dar în metanol cu siguranţă că s-au format complexe moleculare de tipul clorofilă-metanol-clorofilă sau clorofilă-metanol, datorită caracterului bifuncţional al metanolului. Rezultatele obţinute ne conduc deci la presupunerea că aceste complexe moleculare sînt mai rezistente la fotooxidare decît clorofila singură.

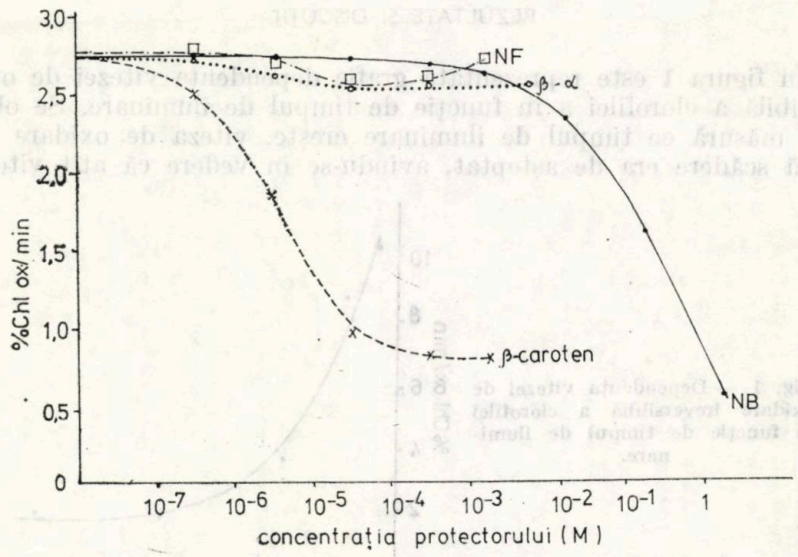


Fig. 2. — Variația vitezei de oxidare ireversibilă a clorofilei în funcție de natura și de concentrația substanței protectoare : NF — nitrofenol ; β-α — β-nitrozo-α-naftol ; NB — nitrobenzen.

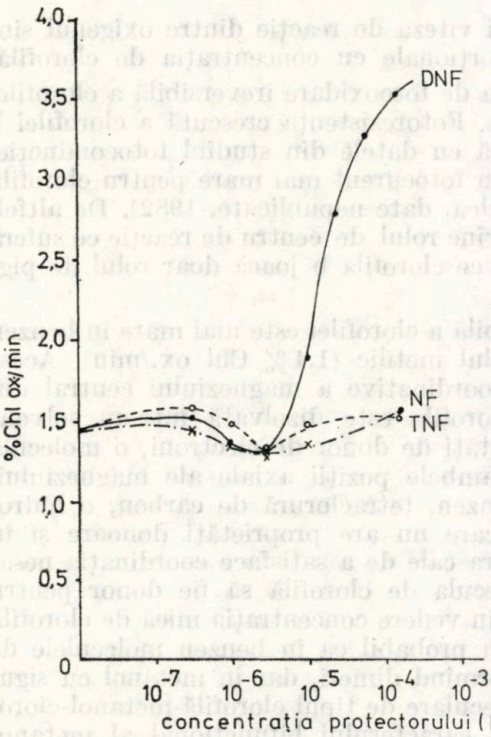


Fig. 3. — Variația vitezei de oxidare ireversibilă a clorofilei în funcție de natura și de concentrația substanței protectoare : NF — nitrofenol ; DNF — 2,4-dinitrofenol ; TNF — trinitrofenol.

În figurile 2 și 3 sînt ilustrate rezultatele obținute din studiul efectului fotoprotector al unor substanțe asupra soluțiilor de clorofilă. Cu

excepția β-carotenului, toate substanțele folosite (β-nitrozo-α-naftolul, nitrobenzenul, nitrofenolul, dinitrofenolul și trinitrofenolul) fac parte din grupa inhibitorilor, după clasificarea lui Vrbaski (9).

Se observă că viteza de fotooxidare ireversibilă a clorofilei poate fi redusă, mărimea acestei reduceri fiind dependentă de tipul de protector folosit și de concentrația lui.

β-Carotenul scade viteza de oxidare ireversibilă a clorofilei chiar atunci cînd se găsește în concentrații foarte mici, 5×10^{-7} M. Cu creșterea concentrației de protector are loc o scădere a vitezei de fotooxidare destul de pronunțată, iar la concentrația de 5×10^{-4} M β-caroten ea rămîne aproximativ constantă (efect de saturare) (vezi fig. 2). Se consideră că efectul protector al β-carotenului este datorat acțiunii lui ca dezexcitant al stării triplet a clorofilei și al stării singlet a oxigenului (10).

Nitrobenzenul are o eficiență mai mare chiar decît a β-carotenului, dar numai atunci cînd este folosit în concentrații foarte mari ($>2{,}5 \times \times 10^{-3}$ M) (vezi fig. 2).

β-Nitrozo-α-naftolul, p-nitrofenolul, 2,4-dinitrofenolul și trinitrofenolul oferă o protecție mai mică soluțiilor de clorofilă (vezi fig. 2 și 3). Eficiența cea mai mare o au la concentrații apropiate de valoarea concentrației de clorofilă, ceea ce conduce la presupunerea că are loc formarea unui complex stoichiometric fotorezistent clorofilă-protector.

p-Nitrofenolul, 2,4-dinitrofenolul și trinitrofenolul sînt cunoscute ca substanțe ce sting fluorescența clorofilei, eficiența lor fiind în ordine crescătoare (11). Ne-am fi așteptat deci ca acestea să aibă o acțiune fotoprotectoare în ordinea trinitrofenol >dinitrofenol >nitrofenol. Din rezultatele noastre se poate trage concluzia că nu există o corelație între proprietățile lor fotoprotectoare și cele de stingători ai fluorescenței.

O observație deosebită se poate face asupra rezultatelor reprezentate în figura 3. 2,4-Dinitrofenolul și p-nitrofenolul prezintă domenii de concentrații în care viteza de oxidare ireversibilă a clorofilei este accelerată. Acest lucru, pe de o parte, demonstrează încă o dată faptul că fiecare protector acționează diferit în funcție de structură și mediu, iar pe de altă parte scoate în evidență mecanismul complex al procesului, din moment ce una și aceeași substanță, în funcție de concentrație, poate mări sau micșora fotoprotecția.

Prezentat la redacție
la 17 martie 1982

Facultatea de fizică, București

IRREVERSIBLE PHOTOBLEACHING OF CHLOROPHYLL SOLUTIONS

SUMMARY

The photostability of chlorophyll solutions has been investigated by a spectrophotometrical method and we pointed out that: (i) the irreversible photobleaching rate of chlorophyll a was higher than that of chlorophyll b; (ii) the reagents ability to prevent chlorophyll photobleaching was found to be dependent on their chemical structure, concentration and the solvent.

BIBLIOGRAFIE

1. A. J. HOFF, Physics Reports, **54**, 77 (1979).
2. D. ARNOFF, G. MACKINNEY, J. Amer. Chem. Soc., **65**, 956 (1943).
3. A.A. KRASNOVSKI, M. O. SHAPOŞNIKOVA, F. F. LITVIN, Biofizika, **19**, 65 (1974).
4. A. A. KRASNOVSKI, Chem. Abstr., **86**, 13973v (1977).
5. H. H. STRAIN, A. A. SVEC, în *The Chlorophylls*, sub red. L. P. VERNON şi R. S. SELLEY, Academic Press, New York, 1966, p. 21.
6. R. LIVINGSTON, S. DUNIEZ, T. THOMAS, N. V. REA, J. Amer. Chem. Soc., **73**, 3388 (1953).
7. J. P. THORNBER, R. S. ALBERTE, F. A. HUNTER, J. A. SHIOZAWA, K.-S. KAN, Brookhaven Symp. in Biol., **28**, 132 (1977).
8. H. H. STRAIN, N. R. THOMAS, J. J. KATZ, Biophys. Biochim. Acta, **75**, 306 (1963).
9. T. VRBASKI, Chem. Abstr., **46**, 9994 (1952).
10. E. A. DAWE, D. A. LONG, S. J. LAND, J. Chem. Soc. Faraday Trans., **73**, 1319 (1977).
11. R. LIVINGSTON, C. L. KE, J. Amer. Chem. Soc., **72**, 909 (1950).

CAROTENOIDE DIN LAPTE ŞI SMÎNTÎNĂ DE VACĂ

V. TĂMAŞ, O. Z. BABIO

Rezumat. S-au făcut investigaţii asupra conţinutului în carotenoide al laptelui şi smîntînii de vacă din probe omogenizate, stabilindu-se o metodă relativ uşor de executat. Rezultatele obţinute sînt corelate cu cele din furaje, astfel încît conţinutul în carotenoide din lapte şi furaj poate constitui un indice biochimic asupra calităţii lor. S-a pus în evidenţă, în smîntînă, 5,6-epoxi-β-caroten.

Laptele şi produsele lactate sînt cele mai complete alimente în ceea ce priveşte conţinutul lor în substanţe nutritive necesare omului şi animalelor. Dintre substanţele organice care intră în compoziţia laptelui, de o deosebită importanţă sînt pigmenţii galbeni (1) reprezentaţi de unele vitamine, cum sînt riboflavina şi retinolul (vitamina A) (2), precum şi de unele carotenoide, precursori ai retinolului. Carotenoidele sînt preluate din hrană, vehiculate prin sînge şi apoi depozitate, în mare parte, în ficat, ţesut adipos, gălbenuş de ou, precum şi în sînge şi lapte, iar o parte sînt convertite în retinol. Din acest motiv, în situaţiile în care furajele sînt carenţate în carotenoide, mai ales în perioada de iarnă, se constată o epuizare a rezervelor lor din sînge şi ficat (1), (3), (4).

În lapte şi în sînge, carotenoidele se află sub formă de complecşi carotenoproteici legaţi de lipide (2). Cantitatea lor în lapte variază în limite destul de largi. Astfel, în laptele de vacă se află în perioada de vară în jur de 60 μg la 100 ml, iar în perioada de iarnă cantitatea lor este mult inferioară, ajungînd pînă la 14 μg la 100 ml lapte; în lunile ianuarie-aprilie pot lipsi complet (3), (4).

Culoarea gălbuie a laptelui şi a smîntînii este un criteriu de apreciere a calităţii lor, demonstrînd prezenţa carotenoidelor. Variaţia culorii gălbui este cauzată de conţinutul diferit în carotenoide (5).

În această lucrare ne-am propus să prezentăm o metodă adecvată de determinare a carotenoidelor, precum şi natura acestor pigmenţi, atît din lapte cît şi din smîntînă de vacă, în diferite perioade şi în funcţie de furajele administrate.

MATERIAL ŞI METODE

Laptele şi smîntîna utilizate au provenit de la Staţiunea didactică experimentală a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj-Napoca. S-a utilizat probă omogenizată, provenită de la un număr mare de vaci. Analizele au fost efectuate o dată pe lună pe perioada 1980—1981.

Determinarea carotenoidelor din furaje. Cantitatea de furaj luată în lucru a variat, în funcţie de natura furajului, de la 5 g în cazul fînului la 50 g în cazul tăiţeilor de sfeclă. Peste materialul măcinat sau fin tăiat şi introdus într-un flacon conic de 250 ml, s-au adăugat 50—100

ml KOH etanolic 15%, s-a lăsat la întuneric timp de 2 ore, s-a extras cu 150 ml amestec acetonă-eter de petrol (1:1) și apoi cu 150 ml amestec de eter etilic-eter de petrol (1:1). Extractele s-au spălat de aproximativ 12 ori cu apă distilată într-o pîlnie de separare. Soluția de pigmenți s-a uscat pe Na_2SO_4 anhidru, s-a evaporat la sec, iar reziduul s-a reluat într-un volum de eter de petrol în vederea spectrofotometrării (6).

Determinarea carotenoidelor din lapte. Cantitatea de lapte luată în lucru a fost de 100 ml în perioada de iarnă și de 50 ml în perioada de vară. Laptele proaspăt, nefiert, măsurat cu un cilindru gradat, s-a introdus într-un balon conic de 800 ml. S-au adăugat 100 ml etanol absolut, s-a agitat timp de aproximativ 5 minute, după care s-au adăugat 200 ml amestec de solvenți, format din eter de petrol și eter etilic (în raport de 1:1, în volume). După agitare de 2—3 ori în vederea omogenizării, s-a lăsat în repaus 10 minute pentru sedimentare. Solventul limpede a fost decantat într-o pîlnie de separare. Extragerea a fost repetată de două ori folosind cîte 50 ml amestec. Extractele s-au reunit și s-au spălat cu apă distilată de aproximativ 10 ori. Extractul final s-a uscat peste Na_2SO_4 anhidru și s-a concentrat la sec în rotavapor. Reziduul s-a reluat cu eter de petrol în vederea spectrofotometrării.

Spectrofotometrarea și calculul. Volumul soluției în eter de petrol s-a măsurat și apoi s-a spectrofotometrat la un Specord UV-VIS, la 450 nm, utilizîndu-se ca martor eter de petrol.

Conținutul de carotenoide s-a calculat după relația:

$$X(\text{în } \mu g) = \frac{E \times v \times 10^6}{2500 \times 100 \times G},$$

în care E = extincția citită, v = volumul soluției pigmenților, G = ml lapte.

Determinarea carotenoidelor din smîntînă. S-au luat 10 ml smîntînă proaspătă, peste care s-au adăugat 50 ml etanol absolut și apoi 100 ml amestec de eter de petrol și eter etilic (1:1). În continuare s-a lucrat ca și în cazul extracției din lapte. Calculul conținutului s-a făcut după relația dată la determinarea carotenoidelor din lapte.

În cazul cînd s-a lucrat cu cantitate mare de smîntînă, a fost necesară saponificarea extractului cu un volum dublu de KOH etanolic 15%, timp de 2 ore la temperatura camerei. Saponificatul s-a trecut în eter etilic, s-a spălat cu apă și s-a evaporat la sec. Reziduul s-a reluat în eter de petrol.

Separarea și identificarea carotenoidelor din extracte. În vederea separării și a identificării carotenoidelor din extractul din lapte și din smîntînă s-a efectuat saponificarea în condițiile arătate la determinarea carotenoidelor din smîntînă.

— *Separarea cromatografică a pigmenților.* Separarea s-a făcut pe coloană cu MgO-celită (1:1) (în cazul cînd s-a lucrat cu cantități mari) sau pe plăci în strat subțire de MgO. Developarea s-a efectuat cu eter de petrol, la care s-a adăugat pînă la 2% benzen (7). Pe cromatogramă s-au separat, în ordinea Rf, următorii pigmenți: luteină, de culoare galbenă, 5,6-epoxi-β-caroten, galben-pai, β-caroten, portocaliu.

— *Identificarea carotenoidelor.* Pentru identificarea carotenoidelor s-au înregistrat spectrele de absorbție, utilizînd un spectrofotometru Specord UV—VIS, și s-au efectuat cocromatograme cu pigmenți autentici. De asemenea s-a făcut repartiția hipofazică între eter de petrol și metanol 95%, respectiv 92%. Pentru 5,6-epoxi-β-caroten s-a efectuat și reacția cu HCl în eter etilic, test specific epoxicarotenoidelor (8), (9).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele medii ale analizelor carotenoidelor din furaje sînt redate în tabela 1. Furajele utilizate sînt destul de heterogene în ceea ce privește conținutul în carotenoide. Deosebit de scăzută valoare în carotenoide au tăițeii de sfeclă.

Valorile pigmenților carotenoidici, prezentate în tabela 2, sînt cuprinse între 10 și 56 μg la 100 ml lapte și între 100 și 155 μg la 100 ml smîntînă. În perioada de vară, cînd conținutul furajelor în carotenoide este ridicat, se constată o creștere a acestora atît în lapte cît și în smîntînă, astfel încît conținutul carotenoidelor din lapte poate constitui un

indice biochimic atît asupra calităţii acestuia, cît şi asupra furajului administrat.

Din cantitatea totală de carotenoide din lapte şi smîntînă, 75—85 % reprezintă β-caroten, iar restul de 15—25 % este alcătuit de luteină, de unii epoxizi şi de alte carotenoide. 5,6-Epoxi-β-carotenul, semnalat pentru prima dată în prezenta lucrare, a putut fi pus în evidenţă în smîntînă în cazul cînd s-au utilizat cantităţi mari de material de ordinul kilogramelor (1—2 kg). Procentul acestui epoxid, care apare în cantitate mare iarna şi mai mică vara, este de 5—10 % din totalul carotenoidelor. Apariţia lui în smîntînă s-ar datora fie unei acumulări din furajele administrate, fie unei biotransformări. Punerea în evidenţă a epoxicarotenoidelor s-a făcut prin poziţia în cromatogramă, prin spectrul de absorbţie şi prin testul epoxidic cu HCl în eter etilic.

Tabela 1

Conţinutul în carotenoide al furajelor

Furaj	Carotenoide (în μg la 100 g furaj)
Fîn	4,700
Siloz	3,020
Nutreţ combinat	0,293
Tăiţei de sfeclă	0,0095
Masă verde	2—50,000

Tabela 2

Carotenoide din lapte şi smîntînă (în μg la 100 ml)

Luna	Lapte		Smîntînă	
	1980	1981	1980	1981
Ianuarie	12,00	11,50	99,00	100,00
Februarie	11,00	10,00	98,00	100,00
Martie	12,00	10,00	99,00	100,00
Aprilie	12,00	12,50	100,00	101,00
Mai	25,00	27,00	120,00	125,00
Iunie	48,00	48,50	150,00	152,00
Iulie	56,00	55,00	155,00	154,00
August	56,00	55,50	154,00	155,00
Septembrie	46,72	47,00	143,70	144,00
Octombrie	38,74	39,00	144,00	143,00
Noiembrie	27,00	26,50	125,75	127,00
Decembrie	20,00	21,00	119,00	120,00

CONCLUZII

În urma analizei carotenoidelor din lapte şi smîntînă de vacă, concomitent cu analiza celor din furajele administrate, se desprind următoarele:

1. S-a stabilit o metodă, adecvată şi relativ uşor de executat, pentru extracţia şi dozarea carotenoidelor din lapte şi smîntînă de vacă.

2. S-a pus în evidenţă în smîntînă 5,6-epoxi-β-carotenul.

3. Conţinutul în carotenoide al laptelui constituie un indice biochimic asupra calităţii lui şi asupra furajului utilizat.

Prezentat la redacţie
la 17 mai 1982

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza”,
3400 Disciplina de biochimie
Cluj—Napoca, str. Mănăştur nr. 3

LES CAROTINOÏDES DU LAIT ET DE LA CRÈME DE VACHE

RÉSUMÉ

Les investigations concernant la teneur en carotinoïdes du lait et de la crème, effectuées sur des prélèvements homogènes par une méthode simple et facile, ont donné des résultats qui sont en corrélation avec ceux obtenus au cas des fourages ; ainsi le contenu en carotinoïdes du lait peut constituer un indice pour apprécier la qualité du fourage. Les mêmes investigations ont permis de mettre en évidence dans la crème la présence de l'époxy-5,6-β-carotine.

BIBLIOGRAFIE

1. C. I. KRUISHEER, P. C. DEN HERDEN, Neth. Milk Dairy J., **7**, 69 (1953).
2. H. HOEFLAKE, Neth. Milk Dairy J., **7**, 227 (1953).
3. K. H. WAGNER, Fette Seifen Anstrichmittel, **59**, 250 (1957).
4. T. J. BUMA, H. K. VAN DER VEEN, R. WEERSTRA, Neth. Milk Dairy J., **31**, 31 (1977).
5. S. PATTON, J. J. KELLY, T. W. KEENAN, Lipids, **15**, 33 (1980).
6. V. TĂMAŞ, GH. SĂLĂJAN, C. BODEA, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).
7. V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, St. cerc. biochim., **20**, 203 (1977).
8. H. H. STRAIN, Arch. Biochem. Biophys., **48**, 458 (1954).
9. C. SUBBARAYAN, H. R. CAMA, J. Sci. Ind. Res., **27**, 306 (1968).

RECENZII

Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56: *Cardiac Glycosides*, Part. II: *Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology* (Tratat de farmacologie experimentală, vol. 56: Glucozidele cardiace, partea a II-a, Farmacocinetică şi farmacologie clinică), sub red. K. GREEF, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 294 p., 64 fig.

În acest volum sînt prezentate pe larg şi sub toate aspectele problemele de farmacocinetică şi farmacologie clinică ale glucozidelor cardiace.

Cartea este împărţită în 14 capitole, scrise de specialişti în materie. Primele patru capitole sînt monografii ale glucozidelor din diverse specii de *Digitala*, *Strophantus*, *Scilla* şi *Convalaria* cu privire la aspectele farmacocinetice ale acestora (distribuţia în organism, metabolizarea, eliminarea) şi la factorii care influenţează aceste procese.

Capitolul 5 tratează problema legării glucozidelor cardiace de albumina serică, legare spontană şi reversibilă, care urmează legea acţiunii maselor. Afinitatea de legare creşte odată cu caracterul hidrofob al substanţelor administrate şi scade cu temperatura. Rolul acestei legări pare a fi cel de reglare a concentraţiei glucozidului liber în apa extracelulară şi plasmatică.

Capitolul 6 se referă la problema absorbţiei şi secreţiei intestinale, care nu este o simplă difuzie, ci un mecanism de transport prin mucoasa intestinală exercitat printr-un sistem secretor.

Capitolul 7 discută preluarea şi legarea glucozidelor de către situsurile receptoare specifice din celulele inimii. Studiile farmacocinetice au fost posibile numai cu substanţe marcate.

Capitolul 8 dezvoltă noţiunea de biodisponibilitate, viteza şi măsura în care substanţa administrată intră în circulaţia şi în ţesuturile organismului de la locul de administrare. Biodisponibilitatea este determinată de caracteristicile chimice ale substanţei, de modul de formulare în vederea administrării şi de factorii fiziologici care acţionează asupra căii de administrare.

Biodisponibilitatea se calculează din concentraţia substanţei în sînge sau din cea excretată prin urină. Ea nu este sinonimă cu absorbţia intestinală deoarece o substanţă absorbită poate fi metabolizată de mucoasa intestinală fără să ajungă în circulaţie.

Capitolul 9 trece în revistă metodele standard folosite pentru controlul calităţii glucozidelor cardiace în plante, substanţe izolate şi preparate farmaceutice.

Capitolele următoare privesc aspectele de farmacologie clinică, şi anume: efectul glucozidelor cardiace asupra cordului normal şi insuficient (inclusiv insuficienţa renală, hepatică, tiroidiană etc.); efectul diferitelor maladii asupra farmacocineticii glucozidelor cardiace; indicaţii referitoare la terapia acestor compuşi; efecte secundare şi factorii care duc la reacţii adverse; interacţiunea dintre glucozidele cardiace şi alte substanţe din organism; factorii care contribuie la necesitatea dozajului variat între pacienţi.

Lucrarea este foarte interesantă, documentată ştiinţific în probleme de actualitate — farmacocinetică — şi foarte utilă specialiştilor în cercetare şi în activitatea practică.

Teodora Vâlsănescu

B. GHEORGHESCU, D. REBEDEA, LIDIA BOICESCU, *Sindromul de malabsorbţie*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1982, 192 p.

Lucrarea prezintă aspectele majore ale sindromului de malabsorbţie în lumina celor mai noi date din literatură, precum şi a rezultatelor proprii obţinute de autori.

Sindromul de malabsorbţie conţine un spectru larg de afecţiuni ale aparatului digestiv, care au ca trăsătură comună incapacitatea de a asigura aprovizionarea organismului, parţial

sau total, cu principiile nutriționale alimentare, vitamine, săruri minerale și apă. Intestinul subțire este considerat un important segment digestiv, cu rol în starea nutrițională, avînd funcții imunologice, endocrine, recent evidențiate și integrate în sistemele biologice de apărare și de homeostazie. Prin urmare, autorii consideră necesar să dedice primele două capitole ale cărții structurii și fiziologiei intestinului subțire.

Cel de-al treilea capitol prezintă sistematic principalele metode de explorare funcțională și morfologică a intestinului, trezind prin aceasta un deosebit interes practic. Testele umorale și radiografiile osoase au o valoare orientativă diagnostică și farmaceutică. Examenele coprologice, reflectînd modificările suferite de principiile alimentare în tractul digestiv, pot indica leziunile posibile în această zonă. Explorarea procesului de maldigestie urmărește secreția exocrină pancreatică, fluxul biliar, secreția gastrică, procesele de disbioză intestinală. Autorii prezintă de asemenea teste de toleranță intestinală, explorarea procesului de exsudație intestinală, a motilității intestinale și metodele morfologice de diagnostic.

Capitolul al patrulea se ocupă de aspecte clinice. Sînt discutați mai întîi factorii principali ce favorizează sau însoțesc sindromul de malabsorbție. Apoi sînt clasificate și caracterizate afecțiunile generatoare ale acestui sindrom: afecțiuni cu mecanisme și cauze intraluminale, afecțiuni cu mecanisme și cauze parietale intestinale, afecțiuni cu mecanisme și cauze mixte și afecțiuni cu mecanisme neelucidate încă. Capitolul se încheie cu principii terapeutice ale sindromului de malabsorbție.

Cartea aduce astfel o serie de informații prețioase, interpretate în lumina datelor de microscopie electronică, histochimice, histoenzimologice, de genetică, radioizotopi, putînd servi ca ghid medicilor practicieni și ca punct de referință pentru cercetătorii acestui domeniu atît de complex.

Elena Ganea

Encyclopedia of Plant Physiology, New Series (Enciclopedie de fiziologie a plantelor), sub red. A. PIRSON și M.H. ZIMMERMAN, vol. 13, partea B : *Plant Carbohydrates, II : Extracellular Carbohydrates* (Glucidele din plante, II : Glucide extracelulare), sub red. W. TANNER și F.A. LOEWUS, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 763 p., 124 fig.

Explozia de informații apărute în ultimii ani privind glucidele din plante a impus apariția acestui volum din noua serie enciclopedică de fiziologie a plantelor. Volumul cuprinde două părți : una care se ocupă de glucidele intracelulare și alta, lucrarea de față, cuprinzînd glucidele extracelulare. Prin „extracelular" se înțelege spațiul din afara membranei plasmatice (plasmalemma), terminologie general acceptată astăzi în biologia celulară.

Cartea cuprinde cinci secțiuni, referitoare la pereții celulari la plantele superioare și la alge și fungi, exportul glucidelor prin peretele celular, interacțiuni la suprafața celulară și interacțiuni glucide-lectine. Descriind în detaliu structura, biosinteza și degradarea componenților chimici ai pereților celulari, primele două secțiuni reușesc să acopere un cîmp larg de cunoștințe.

Cea de-a treia secțiune, intitulată „Exportul materialului glucidic", conține trei capitole referitoare la procesul de secreție, toate moleculele destinate spațiului extracelular fiind considerate ca substanțe secretoare.

Un alt aspect îl constituie rolul glucidelor în anumite funcții biologice, ca interacțiunile gazdă-parazit, polen-pistil, simbiozele, toate făcînd subiectul celei de-a patra secțiuni a cărții.

Ultima secțiune abordează studiul interacțiunilor lectine-glucide. Lectinele sînt proteine sau glicoproteine ce posedă locuri de legare bine definite, foarte specifice pentru anumite glucide, proprietate demonstrată în special atunci cînd aglutinarea este inhibată prin adăugarea unor glucide sau glicoproteine cu lanțuri glucidice corespunzătoare. Autorii discută proprietățile biochimice ale lectinelor, precum și aplicarea acestora la sistemele animale. Sînt de asemenea studiate lectinele din plantele superioare, distribuția lor în diferite țesuturi și localizarea subcelulară, ca și relațiile posibile dintre lectine și enzime. Mecanismul prin care, în cadrul simbiozei, interacționează doi parteneri atît de diferiți biologic, cum sînt plantele superioare și microorganismele, nu se cunoaște. Conform celor discutate în acest capitol, se pare că lectinele au un rol important în diverse interacțiuni simbiotice.

Cartea conține un material deosebit de valoros pentru toți cei interesați în fiziologia plantelor, demonstrînd totodată importanta participare la procesele fiziologice de creștere și dezvoltare a glucidelor, care pentru o vreme au fost neglijate datorită accentului pus mai ales pe studiul proteinelor și acizilor nucleici.

Elena Ganea

P. HERMANN, *Kompendium der allgemeinen und anorganischen Chemie* (Compendiu de chimie generală și anorganică), ediția a III-a revizuită, VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982, 287 p., 62 fig., 51 tabele și un pliant

Bazat pe o bogată activitate didactică desfășurată în cadrul învățămîntului medical superior, autorul prezintă într-o formă clară și concisă noțiunile generale de chimie generală și analitică pentru studenții în medicină umană și veterinară și pentru cei de la facultățile de biologie și farmacie, științe agricole, unde chimia este o disciplină de bază. Acest compendiu, complet revizuit în actuala sa ediție, ține seama de Sistemul internațional al unităților și de recomandările recente ale IUPAC și este util în aceeași măsură și pentru cadrele didactice de la disciplinele științelor biologice amintite.

După un prim capitol referitor la structura atomilor și a moleculelor, în care sînt prezentate și sistemul periodic al elementelor, precum și diferitele tipuri de legături chimice, în cel de-al doilea capitol autorul se ocupă de starea fizică a materiei, tratînd pe rînd stările de agregare, soluțiile, sistemele heterogene și interacțiunile dintre materia și radiația electromagnetică (reacții fotochimice, diferite tipuri de spectre). Capitolul al treilea, cel mai extins și detaliat prezentat, se referă la reacțiile chimice. Autorul expune pe rînd și foarte sistematizat noțiunile generale despre desfășurarea reacțiilor chimice și termodinamica chimică, apoi mecanismul reacțiilor chimice, aplicațiile legii acțiunii maselor și, în sfîrșit, reducerea și oxidarea. Ultimul capitol este dedicat chimiei celor mai importante elemente ale sistemului periodic și se împarte în două subcapitole : chimia nemetalelor și chimia metalelor.

Pentru o mai bună înțelegere a celor prezentate, textul este însoțit de numeroase exemple practice de calcul, reacții chimice, reprezentări schematice, diagrame și tabele. Acest compendiu cuprinde, pe lîngă tabelele cu masele atomice relative ale elementelor și cu Sistemul internațional al unităților, și o scurtă bibliografie selectivă cu cărți recomandate pentru aprofundarea anumitor aspecte tratate în capitolele din carte și se încheie cu un util index alfabetic pe subiecte, îngrijit prezentat.

Horst D. Schell

HORST REINBOTHE, GERARD-JOACHIM KRAUSS, *Entstehung und molekulare Evolution des Lebens* (Apariția și evoluția moleculară a vieții), VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982, 65 fig., 21 tabele, 7 fototabele

Lucrarea încearcă să explice, pe baza celor mai moderne cunoștințe de biologie moleculară, apariția vieții pe pămînt, într-o viziune cosmologică caracterizată prin concepția conform căreia apariția vieții și evoluția biologică sînt părți integrante ale evoluției planetei noastre.

Principiile care stau la baza organizării vastului material faptic al lucrării sînt următoarele : 1) viața a apărut pe pămînt ca un fenomen natural ; 2) evoluția darwiniană a fost precedată de o evoluție chimică ; 3) viața a apărut ca o consecință a interacțiunii anterioare dintre acizii nucleici, purtători de informație, și moleculele proteice, responsabile, prin structura lor specifică, de funcțiile prin care organismele vii se adaptează condițiilor externe de mediu ; 4) ca în toate procesele dialectice, în care întîmplarea și necesitatea constituie motorul evoluției, evoluția biologică (în sens darwinian) se bazează pe mutație (variabilitate) și selecție ; 5) fluxul de informație are un sens unic : de la acizii nucleici la proteine ; 6) ființele vii constituie un tip special de structuri disipative, care există prin pierdere de energie.

În ciuda analogiilor posibile dintre sistemele vii, mereu perfecționate în cursul evoluției, și optimizarea sistemelor tehnice, principiul reducționismului se exclude prin faptul că pe scară biologică apar legi calitativ noi, care delimitează această scară de sistemele inferioare pe care biologicul le integrează. În acest sens se accentuează ideea că, odată cu auto-

reproducerea moleculelor în evoluția prebiotică, se atinge o nouă calitate în evoluția cosmologică.

Științele biologice au acumulat, în puținii ani, un imens material faptic, dar prelucrarea și interpretarea acestuia sînt încă în curs de elaborare. Desigur, multe fapte experimentale care se vor mai acumula vor facilita acest proces.

Margareta Dumitrescu

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents (Monografii asupra evaluării riscului cancerigen al substanțelor chimice la om. Unii agenți antineoplastici și imunosupresivi), vol. 26, IARC, Lyon, France, 1981, 411 p.

În cadrul programului de publicare sub forma unor monografii a datelor privind proprietățile cancerigene ale substanțelor chimice, program inițiat în 1971 de Agenția Internațională pentru Cercetări asupra Cancerului (IARC) în colaborare cu Organizația Mondială a Sănătății (WHO), a apărut volumul 26 (mai 1981).

Acest volum cuprinde 18 monografii asupra unor medicamente antineoplazice și imunosupresoare, antimetaboliți, inhibitori mitotici, și anume 5-azactidină, azatioprină, BCNU, bleomicină, clorambucil, CCNU, cisplatină, ciclofosfamid, dicarbazină, 5-fluouracil, izofosfamidă, 6-mercaptopurină, metotrexat, prednison, procarbazină, treosulfan, vinblastină, vincristină.

Evaluarea proprietăților cancerigene ale acestor compuși a constituit o problemă deosebit de dificilă dintr-o serie de motive. Astfel, fiind vorba de compuși cu acțiune antineoplazică, substanțele respective inhibă dezvoltarea tumorilor, dar în același timp ar putea provoca dereglări care să genereze cancer. Dereglările sînt greu de observat pe animale de experiență și/sau pe om. La aceasta contribuie, de exemplu, efectul imunosupresor al acestor medicamente, care la animale, mai ales în doze mari, poate modifica chiar durata de viață. De asemenea, la om, substanțele respective sînt folosite clinic în diverse combinații conform unor protocoale complicate, adeseori incluzînd radioterapia, nefiind posibilă evaluarea cancerigenicității individuale.

Pentru o serie de pacienți apar probleme de studiu și datorită limitelor de viață determinate de boala pentru care au fost administrate medicamentele.

Studiile epidemiologice nu sînt complete pentru majoritatea substanțelor considerate, în literatura de specialitate prezentîndu-se cu precădere cazuri.

Lipsa unor studii sistematice care să permită evaluări certe pentru Grupul de lucru al IARC provine și din faptul că medicamentele incluse în volum sînt substanțe administrate unor bolnavi cu neoplazii avansate, care rareori supraviețuiau fără terapie, astfel că interesul pentru complicațiile ulterioare a fost minor.

Informații mai bune au putut fi obținute în special pentru medicamente folosite și în boli neneoplazice.

De aceea, din cele 18 medicamente studiate în volum, concluzii certe privind evaluarea caracterului cancerigen au putut fi emise (în cadrul normelor Grupului de lucru al IARC) numai pentru azatioprină, clorambucil, ciclofosfamid, procarbazină și treosulfan.

Cu toate acestea, celelalte informații prezentate asupra substanțelor considerate, inclusiv efectele toxice, toxicitatea prenatală, pe animale de experiență sau pe oameni, cancerigenicitatea pe animale, mutagenicitatea etc., sînt deosebit de utile tuturor celor interesați asupra acestor substanțe (chimiști, biologi, medici, farmaciști).

Volumul 26 din seria IARC se încheie cu un index cumulativ asupra monografiilor privind cancerigenicitatea unor substanțe chimice, publicate de IARC.

Mihai Zamfir

Directory of On-going Research in Cancer Epidemiology (Anuar asupra cercetărilor în curs în epidemiologia cancerului), IARC Publication No. 38, IARC Lyon, 1981 ; DKFZ Heidelberg, 1981, 697 p.

Publicarea unor anuare ale cercetărilor în curs asupra aspectelor epidemiologice în cancer a început în anul 1976, de cînd au cunoscut o permanentă dezvoltare. Scopul acestor publicații este de a aduce la cunoștința cercetătorilor nivelul studiilor și necesarul de efort supli-

mentar privind epidemiologia cancerului, prin prezentarea proiectelor în curs de desfășurare în diverse țări în acest domeniu. Aceste proiecte se referă la examinarea unor caracteristici ale bolnavilor de cancer, la testarea unor ipoteze asupra îmbolnăvirilor și bolnavilor ținînd seama de obiceiuri și expuneri, la studii asupra unor grupuri cu expuneri specifice, la studii privind corelarea dintre creșterea riscului de apariție a cancerului și anumite expuneri, la examinarea riscului de îmbolnăvire pe ocupații sau la iradiere, la studii statistice generale de incidență a bolii, la studii asupra ipotezei etiologiei virale a cancerului.

Anuarul din 1981 are următorul conținut : lista proiectelor, lista cercetătorilor, indexul de termeni, indexul de localizări ale bolii, indexul de substanțe chimice, indexul de tipuri de studiu, indexul de ocupații etc.

Pentru fiecare proiect se indică autorii cu adresa acestora, titlul proiectului, o descriere generală a acestuia, cuvinte-cheie, localizarea afecțiunii studiate, perioada de timp, poziția geografică, substanțele chimice implicate.

Anuarul nu conține lucrări publicate sau în curs de publicare, fiind astfel o sursă de informare preliminară de maximă importanță într-un domeniu în care durata cercetărilor poate fi foarte lungă.

Realizarea anuarelor a constituit o sarcină deosebit de dificilă. Alegerea colaboratorilor, ampla corespondență cu aceștia, selectarea proiectelor raportate, alcătuirea anuarelor într-o formă cît mai utilă au constituit o activitate la care au participat numeroși specialiști.

Ca sursă de informare, anuarul este o completare valoroasă a lucrărilor publicate în domeniu, multe dintre rezultatele cercetărilor în curs urmînd a fi publicate în viitor, permițînd totodată orientarea noilor studii asupra aspectelor epidemiologice în cancer.

Mihai Zamfir

Laboratory Decontamination and Destruction of Aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 *in Laboratory Wastes* (Decontaminarea în laborator și anihilarea aflatoxinelor B_1, B_2, G_1, G_2 din reziduurile de laborator), IARC Scientific Publications No. 37, sub red. M. CASTEGNARO și colab., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1980, 62 p.

Cunoscîndu-se acțiunea cancerigenă asupra ficatului, mai rar asupra rinichiului și intestinului, a aflatoxinelor B_1, B_2, G_1 și G_2, IARC împreună cu alte foruri naționale din domeniul sănătății publică metodele de decontaminare a laboratorului și de anihilare a acestor substanțe în reziduurile de laborator.

După introducere, care cuprinde și referiri la metodele de determinare a acestor substanțe în diferite medii, urmează o expunere sintetică a posibilităților de tratare chimică a acestor medii, pentru degradarea aflatoxinelor și, ca urmare, pentru anularea efectelor respective.

În principal, se insistă asupra aplicării metodelor de decontaminare și distrugere a aflatoxinelor în laborator : soluții apoase, neapoase, echipament de laborator, cuști de animale, îmbrăcăminte etc. Aceste metode se referă la tratarea cu hipoclorit de sodiu, amoniac, var nestins, permanganat de potasiu.

Volumul mai cuprinde două apendixuri : A) nomenclatură, date fizice și chimice, metabolism și produși de degradare a aflatoxinelor ; B) tehnici de degradare biologică și reacții chimice ale aflatoxinelor, încheindu-se cu o bibliografie detaliată.

Vl. Gheorghiescu

Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 98 : *Retrovirus genes in lymphocyte function and growth* (Probleme curente în microbiologie și imunologie, vol. 98 : Gene retrovirus în funcția și creșterea limfocitului), sub red. E. WECKER și I. HORAK, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1982, 142 p., 8 fig.

Acest volum reprezintă o selectare a numeroaselor lucrări comunicate la Seminarul „Implicarea retrovirusurilor endogene în funcția normală și creșterea patologică a limfocitelor", care a avut loc între 7 și 9 mai 1981 la Institutul de virusologie și imunologie al Universității din Würzburg (R. F. Germania).

Capitolul 1 se ocupă de retrovirusurile endogene la șoareci și pui de găină. Baza genetică a transformării induse retroviral este expusă în capitolul 2. Următoarele două capitole

tratează despre exprimarea virusurilor murinice leucemice xenotropice și, respectiv, exprimarea genelor virale endogene în limfocitele de șoarece. În capitolul 5 se discută despre proteine oncovirale ca antigene celulare, pentru ca în capitolul 6 să fie expuse problemele care se referă la reglarea proliferării și diferențierii limfocitelor de către limfochine. Capitolul 7 tratează despre mecanismele imunologice posibile în leucemogeneza virală de tip C la șoareci, iar capitolul 8 se ocupă de limfomageneza retrovirusului, și anume despre relația receptorilor imuni normali față de proliferarea celulară malignă. Penultimul capitol tratează aspectele văzute din punctul de vedere al unui imunolog, și anume inamici din interior sau prieteni de demult? În ultimul capitol sînt expuse perspectivele relative la retrovirusuri endogene în creșterea normală și patologică.

Indicațiile bibliografice legate de problemele care au constituit conținutul acestui volum sînt date la sfîrșitul fiecărui capitol.

Volumul se încheie cu un index de subiecte.

Corina Mihail

Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 89 (Revista de fiziologie, biochimie și farmacologie, vol. 89), sub red. R.H. ADRIAN, E. HELMREICH, H. HOLZER, R. JUNG, O. KRAYER, R.J. LINDEN, F. LYNEN, P.A. MIESCHER, J. PIIPER, H. RASMUSSEN, A.E. U. TRENDELENBURG, K. ULRICH, W. VOGT, A. WEBER, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 254 p., 39 fig.

Volumul debutează cu un articol omagial, scris de E. Heinz în memoria profesorului Walther Windbrandt, prin a cărui dispariție în 1979 domeniul biologiei care se ocupă de transportul prin membrană a pierdut pe unul dintre pionierii săi. El a abordat cu îndrăzneală noi căi și metode care au devenit mai tîrziu procedee standard și a dezvoltat o concepție științifică solidă referitoare la transportul biologic, care s-a dovedit apoi fundamentală pentru multe alte studii ce au urmat.

Articolul următor, intitulat „Balanța apei în plămîni", tratează diferite aspecte, cum sînt factorii care controlează balanța apei în plămîni, anatomia plămînului în legătură cu schimbul de lichide, parametrii variabili în ecuația Starling, mecanismele răspunzătoare la edeme pulmonare, alte influențe asupra balanței apei din plămîni, precum și măsurarea apei din plămîni.

În final, un foarte bogat material bibliografic, cu date la zi, încheie acest capitol.

Un alt articol de mare interes se ocupă de „Răspunsul intestinal față de vitamina D", în care se includ problemele referitoare la epiteliul intestinal, la transportul calciului și fosforului, la mediatorii acțiunii vitaminei D, precum și la imaginarea unui model de acțiune a vitaminei D în intestin. Materialul bibliografic din final conține un număr de aproape 500 de indicații, fiind de un real folos pentru cei ce studiază aspecte legate de tractul intestinal.

Ultimul articol tratează despre „Energetica exercițiului muscular", în care, după un scurt istoric asupra cunoștințelor în acest domeniu din antichitate și pînă în zilele noastre, sînt studiate sursele de energie ale contracției musculare, energetica chimică a contracției musculare, oxidările, mecanismul lactic, fenomene întîmplătoare, mecanismul alactic, precum și puterea și capacitatea maximă a mușchiului.

Și în acest caz indicațiile bibliografice sînt extrem de numeroase, utile și cu cele mai recente date referitoare la acest aspect.

Volumul se încheie cu un index de autori și un index de subiecte.

Corina Mihail

J. PALTI, *Cultural Practics and Infections Crop Diseases* (Practicile de cultură și bolile infecțioase ale semințelor), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 43 fig., 51 tabele

Lucrarea se referă la un singur grup de agenți care afectează sănătatea semințelor, și anume la agenții patogeni, făcînd abstracție de acțiunea directă a dăunătorilor animali sau a factorilor climatici sau fiziologici. Totuși, deoarece agenții patogeni acționează în mod corelat cu ceilalți agenți biotici sau abiotici ai mediului, precum și cu practicile de cultură, influența

acestora din urmă asupra bolilor infecţioase ale seminţelor este sistematic tratată în cuprinsul cărţii.

Volumul cuprinde trei părţi : „Climatul, recolta şi bolile seminţelor" ; „Practicile majore în cultivarea plantelor agricole şi efectul lor asupra bolilor seminţelor" ; „Interacţiunea dintre practicile de cultură, ameliorarea pentru rezistenţa la boli şi aplicarea chimicalelor. Combaterea integrată a bolilor".

În scopul unei producţii mondiale de seminţe menite să servească rapid creşterea populaţiei globului se prevăd : a) extinderea producţiei agricole pe suprafeţe încă necultivate ; b) intensificarea producţiei pe suprafeţe deja cultivate ; c) creşterea de noi seminţe cu proprietăţi nutritive îmbunătăţite ; d) educarea fermierilor pentru a utiliza mai bine resursele existente.

Margareta Dumitrescu

Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics (Biologie moleculară, biochimie şi biofizică), nr. 3, de TREVOR ROBINSON, ed. a II-a, *The Biochemistry of Alkaloids* (Biochimia alcaloizilor), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 225 p., 35 fig.

Prezenta lucrare, a cărei primă ediţie a apărut în 1968, s-a dovedit deosebit de interesantă pentru un mare număr de specialişti, fiind necesară în 1981 reeditarea ei. Acest lucru îşi găseşte explicaţia în faptul că, deşi cunoscuţi de mult timp, alcaloizii continuă să ridice numeroase probleme interesante. Ideea că aceşti compuşi sînt produse secundare ale metabolismului vegetal este acum depăşită şi lucrarea de faţă nu numai că o elimină, dar totodată o înlocuieşte cu o încercare de explicare corectă, ceea ce nu este foarte uşor, dar autorul în multe cazuri reuşeşte (de exemplu, ricinidina). Heterogenitatea acestor compuşi impune aplicarea unui stil de tratare neunitar, însă cu toate acestea logic. Prezentarea compuşilor se face în funcţie de structura chimică (derivaţi de aminoacizi, derivaţi piperidinici, pirolidinici, piridinici, tropanici, izochinolinici etc.), dar şi de origine (alcaloizi din lupin, amarilidacee, ergot etc.). Trebuie însă remarcat că aceste două criterii sînt aplicate în mod foarte judicios, lăsînd o temeinică impresie de continuitate. Cheia acestui efect este prezentarea chimiei şi metabolismului acestor compuşi, ceea ce se realizează cu multă claritate, într-un mod sintetic şi elegant, astfel încît prezentarea atinge un înalt nivel de eficienţă informativă. Cele 19 capitole, 17 monografice şi 2 teoretice („Metabolismul alcaloizilor exogeni" şi „Efectele biochimice ale alcaloizilor"), conţin multe elemente de fiziologie şi chimie organică.

Lucrarea are un index pe subiecte, care uşurează mult manevrarea sa.

Mihai Zamfir

ORSZÁGOS MŰSZAKI INFORMÁCIÓS KÖZPONTI ÉS KÖNYVTÁR
1963

ÎN EDITURA ACADEMIEI A APĂRUT:

MIOARA CÂRSTEANU și C. VLĂDESCU, **Colagenul – biochimie și fiziologie**, 1982, 152 p.

Impusă de rolul deosebit pe care cercetarea științifică îl acordă în prezent colagenului, cea mai importantă și mai abundentă proteină din organismul uman, care conferă rezistență și integritate structurală țesuturilor, lucrarea pune la dispoziția cititorilor o sinteză a informațiilor din literatura mondială de specialitate, redînd totodată, succint, unele rezultate obținute de școala românească în acest domeniu.

Sînt puse în evidență contribuțiile originale ale autorilor cu privire la efectul radiațiilor ionizante asupra metabolismului global al colagenului și asupra colagenului hepatic la om și animale, modificările colagenului în condiții de îmbătrînire a organismului („proteina bătrîneții"), unele reacții de comportament ale colagenului *in vitro*, modificări ale biochimismului colagenului în unele boli de piele, ca sclerodermie, lupus eritematos, stări alergice.

Prin datele fundamentale, prin modelele și tehnicile moderne de investigație, ca și prin studiile de aplicație practică medicală, lucrarea se adresează în egală măsură medicilor, biochimiștilor, biologilor, biofizicienilor, specialiștilor în industria farmaceutică și cercetătorilor din domeniile conexe.

T. CERC. BIOCHIM., TOMUL 25, NR. 2, P. 121–194, BUCUREȘTI, IULIE–DECEMBRIE 1982

c. 2478 I. P. Informația

43 816

Lei 30